



FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**Determinantes estructurales que regulan la  
función de la isoforma beta de la  
fosfatidilinositol 4~fosfato 5~kinasa**

**TESIS DOCTORAL**

**JUAN CARLOS DE KARAM FRANCISCO**

Madrid, 2015









UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**Determinantes estructurales que regulan la  
función de la isoforma beta de la  
fosfatidilinositol 4~fosfato 5~kinasa**

**TESIS DOCTORAL**

Madrid, 2015

Memoria presentada por Juan Carlos de Karam Francisco para  
optar al título de Doctor Madrid, Febrero 2015.



El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección de los Doctores Santos Mañes Brotón y Rosa Ana Lacalle Blanco.



# Índice





<b>Índice .....</b>	<b>7</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>13</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>17</b>
<b>1.Introducción .....</b>	<b>25</b>
<b>1.1. Las fosfatidilinositol 4-fosfato-5-kinasas de tipo I (PIP5KI). .....</b>	<b>25</b>
1.1.1 El fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2). .....	25
1.1.2. Isoformas, variantes de splicing y localización subcelular de las PIP5KI .....	26
<b>1.2. Dominios funcionales de las PIP5KI.....</b>	<b>28</b>
1.2.1. El dominio quinasa y la especificidad de sustrato.....	28
1.2.2 Regulación de la localización y actividad de las PIP5KI por los dominios N- y C-terminal.....	30
<b>1.3. La interacción de PIP5KI<math>\beta</math> con proteínas con dominios PDZ. ....</b>	<b>33</b>
1.3.1. Características de los dominios PDZ. ....	33
1.3.2. PIP5KI $\beta$ interacciona con los PDZ de EBP50. Efecto en polarización y migración de leucocitos.....	36
1.3.3. Los dominios PDZ de EBP50. ....	38
<b>1.4. Evidencias sobre la dimerización de las PIP5KI. ....</b>	<b>45</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>51</b>
<b>3. Materiales y Métodos.....</b>	<b>55</b>
<b>3.1. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos.....</b>	<b>55</b>
3.1.1. Plásmidos. ....	55
3.1.2. Clonajes.....	56
<b>3.2. Técnicas de manipulación y análisis de proteínas. ....</b>	<b>58</b>
3.2.1. Obtención de extractos proteicos. ....	58
3.2.2. Electroforesis de proteínas e inmunoblot.....	58
3.2.3. Digestión con proteasas.....	59
3.2.4. Ultracentrifugación analítica de proteínas.....	60
3.2.5 Ensayos de GST-pull-down e Inmunoprecipitación. ....	60
3.2.6. Ensayos ELISA. ....	61
<b>3.3. Expresión de las proteínas en <i>E. coli</i> y purificación. ....</b>	<b>61</b>
3.3.1. Cromatografía de afinidad.....	62
3.3.2. Cromatografía de exclusión molecular .....	63
3.3.3. Purificación de cuerpos de inclusión y renaturalización en columna. ....	63

3.4. Cristalización de proteínas .....	64
3.5. Estructura de proteínas y modelos estructurales. ....	65
3.6. Cultivos celulares y transfección de células eucariotas. ....	66
3.7. Expresión de proteínas en el sistema de Baculovirus. ....	67
3.8. Sistema de Dobles Híbridos en Levaduras. ....	69
3.9. Purificación de proteínas de interacción con “doble tag en tandem”. ....	70
3.10. Espectrometría de masas. ....	70
3.11. Inmunofluorescencia y ensayos de polarización. ....	71
3.12. Análisis de FRET. ....	71
3.13. Medidas de presión superficial en monocapas lipídicas. ....	72
3.14. Ensayos quimasa de lípidos. ....	73
<b>4. Resultados .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1. Estudio cristalográfico de la interacción del extremo carboxilo de PIP5KI<math>\beta</math> con los dominios PDZ de la proteína EBP50. ....</b>	<b>77</b>
4.1.1. Purificación de las proteínas de fusión PDZ1-LDVYL y PDZ2-LDVYL. ....	77
4.1.2. Cristalización de la proteína PDZ1-LDVYL. ....	80
4.1.3. Resolución de la estructura cristalina del dominio PDZ1 de EBP50 en interacción con el C-terminal de PIP5KI $\beta$ .....	81
4.1.4. Determinantes estructurales de la afinidad y especificidad de la interacción PDZ1-LDVYL. ....	82
4.1.5. Comparación de la estructura de PDZ1-LDVYL con estructuras resueltas de la interacción de PDZ1 con diversos ligandos. ....	86
4.1.6. Cristalización de la proteína PDZ2-LDVYL. ....	88
4.1.7. Modelización de la interacción del C-terminal de PIP5KI $\beta$ con el PDZ2 de EBP50. ....	89
4.1.8. Análisis estructural de las mutaciones PIP5KI $\beta$ <sup>(-3)D/K</sup> , EBP50 <sup>R40D</sup> y EBP50 <sup>K19D</sup> . Implicaciones en la interacción. ....	90
<b>4.2. Purificación de la proteína PIP5KI<math>\beta</math> para la determinación de su estructura cristalográfica. ....</b>	<b>97</b>
4.2.1. Expresión y purificación de PIP5KI $\beta$ en <i>E. coli</i> . ....	98
4.2.2. Expresión y purificación de PIP5KI $\beta$ como proteína de fusión a “Maltose Binding Protein” (MBP). ....	101
4.2.3. Expresión y purificación de PIP5KI $\beta$ en Baculovirus. ....	104
<b>4.3. Identificación de nuevas proteínas de interacción con PIP5KI<math>\beta</math>. ....</b>	<b>106</b>
4.3.1. Búsqueda de proteínas de interacción con PIP5KI $\beta$ con el sistema de levadura de “Doble Híbrido”. ....	106

4.3.2. Búsqueda de proteínas de interacción con PIP5KI $\beta$ mediante el sistema de purificación con “doble tag en tandem” .....	108
4.3.3. Análisis de la interacciones PIP5KI $\beta$ /MRCKg y PIP5KIb/ASAP2. ....	110
<b>4.4. Estudio funcional de la homo y heterodimerización de PIP5KIb. ....</b>	<b>113</b>
4.4.1 Homo y heterodimerización de PIP5KIb. ....	113
4.4.2. Formación de homo- y heterodímeros de PIP5KIb y PIP5KI $\gamma$ _i2 en células.....	114
4.4.3. Efecto de la polimerización de actina en la formación de dímeros $\beta/\gamma$ . ....	115
4.4.4. Modulación de la dimerización de PIP5KI $\beta$ y PIP5KI $\gamma$ _i2 por EBP50 y Talina... 116	
4.4.5. Identificación de la región de dimerización de PIP5KI $\beta$ . ....	118
4.4.6. Identificación de los residuos de la región N-terminal claves en la dimerización de PIP5KI $\beta$ . ....	120
4.4.7. Efectos de la dimerización en la localización subcelular de PIP5KI $\beta$ . ....	122
4.4.8 Efecto de la dimerización sobre la actividad quinasa de PIP5KI $\beta$ . ....	124
<b>5. Discusión .....</b>	<b>129</b>
5.1. Estructura del complejo PIP5KI $\beta$ C-terminal / PDZ1 de EBP50. ....	129
5.2. Estructura del complejo PIP5KI $\beta$ C-terminal / PDZ2 de EBP50. ....	132
5.3. Modelado de mutantes de PIP5KI $\beta$ C-terminal y del PDZ1 de EBP50. ....	133
5.4. Intento de cristalización de PIP5KI $\beta$ . ....	134
5.5. Nuevos ligandos de PIP5KIb. ....	135
5.6. Dimerización de PIP5KI. ....	137
<b>6. Conclusiones. ....</b>	<b>143</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>147</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>175</b>



# Resumen



## Resumen

El fosfatidilinositol (4,5) bifosfato (PIP2) es una molécula reguladora de procesos tan importantes como la quimiotaxis. Las principales enzimas que sintetizan PIP2 a partir de fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P) son las fosfatidilinositol 4-fosfato 5-kinasas de tipo I (PIP5KI) cuya familia consta de tres isoformas,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y sus variantes de “splicing”. Nuestro grupo ha descrito el papel clave de la isoforma beta (PIP5KI $\beta$ ) en la polarización y quimiotaxis de leucocitos. Los últimos 4 aminoácidos (DVYL) de su dominio C-terminal constituyen un motivo de unión a dominios PDZ (PSD-95, DLG, ZO-1) que permite la interacción con la proteína EBP50 y la formación de un complejo con Moesina y RhoGDI, necesario para la activación de la GTPasa RhoA en el urópodo celular. La estructura de las PIP5KI no ha sido resuelta hasta el momento y con la excepción del motivo de interacción con Talina en PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub>, se desconocen los detalles estructurales y conformacionales que regulan la función de las PIP5KI en general, y de la PIP5KI $\beta$  en particular.

En este trabajo hemos resuelto la estructura cristalográfica del complejo entre la región C-terminal de PIP5KI $\beta$  y el dominio PDZ1 de EBP50. Identificamos, a partir de la estructura, los determinantes estructurales de la afinidad y especificidad de esta interacción, lo cual ha permitido modelar, mediante dinámica molecular, mutantes de PIP5KI $\beta$  y del dominio PDZ1 de EBP50, y explicar su pérdida de interacción. También hemos modelado la interacción entre la región C-terminal de PIP5KI $\beta$  y el dominio PDZ2 de EBP50, estableciendo analogías y diferencias en la interacción con ambos dominios. Hemos identificado ASAP2 como un nuevo “partner” de PIP5KI $\beta$ , que explicaría la regulación de las proteínas ARF por esta quinasa lipídica. Estudios de mutagénesis implican la región 110-318 de la PIP5KI $\beta$  como importante para la interacción con ASAP2. Esta región de interacción con ASAP-2 es adyacente al dominio de dimerización que hemos identificado en PIP5KI $\beta$ . Aunque la homología estructural con las fosfatidilinositol 5-fosfato 4-kinasas (tipo-II) sugería que las PIP5KI podrían dimerizar, esto nunca se había demostrado. Empleando ensayos de co-inmunoprecipitación, espectrometría de masas, ELISA y FRET demostramos que las PI5KI forman homo y heterodímeros tanto *in vitro* como en células vivas. La mutagénesis dirigida nos permitió identificar el dominio de dimerización de la PIP5KI $\beta$  en la hélice- $\alpha$  y la lámina- $\beta$  de la región N-terminal de la proteína, y los modelos sugieren que la dimerización requeriría la agregación de estas dos estructuras. Los mutantes que no dimerizan apenas poseen actividad enzimática y no se localizan en la membrana plasmática. Nuestros resultados por tanto indican que la dimerización es una característica intrínseca de las PIP5KI capaz modular su actividad enzimática y localización subcelular, e identifican el motivo de dimerización como una región clave en la regulación de la función de estas proteínas.

## Summary

Phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PIP<sub>2</sub>) regulates several important cell processes, including chemotaxis. Its synthesis from phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) is mediated mainly by type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases (PIP5KI). The PIP5KI family comprises three isoforms,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and their splice variants. Our group described a key role for the beta isoform (PIP5KI $\beta$ ) in leukocyte polarization and chemotaxis. The last four amino acid residues of its C-terminal domain constitute a PDZ domain (PSD-95, DLG, ZO-1) binding motif that allows interaction with the EBP50 protein and therefore, formation of a complex with moesin and RhoGDI, needed for GTPase RhoA activation in the cell uropod. PIP5KI structure has not yet been resolved and, with the exception of the talin-binding motif in the PIP5KI $\gamma$ \_i2 isoform, no structural or conformational details have been defined that explain PIP5KI regulation.

In this study, we resolved the crystal structure of the complex formed by the PIP5KI $\beta$  C-terminal region and the EBP50 PDZ domain. Affinity and specificity determinants of this interaction were identified from the structure, which allowed us to use molecular dynamics to model some mutants of PIP5KI $\beta$  and the PDZ1 domain of EBP50, and thus to explain their loss of interaction. We also modeled the interaction between the PIP5KI $\beta$  C-terminal region and the EBP50 PDZ2 domain, and established analogies and differences in the interaction between them. ASAP2 was identified as a new PIP5KI $\beta$  partner, which could explain the regulation of ARF proteins by this kinase. Our mutagenesis studies showed that the region comprising PIP5KI $\beta$  amino acids 110 to 318 is involved in the interaction with ASAP2; this region is adjacent to the dimerization domain identified in PIP5KI $\beta$ . The structural homology of this kinase with phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinases (type II) suggests that PIP5KI forms dimers, although this had not been demonstrated. Here we used co-immunoprecipitation, mass spectrometry, ELISA and FRET assays to demonstrate that the PI5KI form homo- and heterodimers *in vitro* and in living cells. The PIP5KI $\beta$  dimerization domain was identified in the  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet of the N-terminal region by site-directed mutagenesis. The models suggested that aggregation of these two structures is necessary for protein dimerization. Mutants that did not form dimers showed little enzymatic activity and did not localize to the plasma membrane. Our results suggest that dimerization is an intrinsic characteristic of PIP5KI that modulates their enzyme activity and subcellular localization, and identify the dimerization motif as a key region in the regulation of these proteins.



# Abreviaturas



## Abreviaturas

aa	Aminoácidos
Aba	Aureobasidina A
Actividad GTPasa	Actividad enzimática que hidroliza GTP
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
	Criterio de información de Akaike corregido
AICc	para muestras pequeñas
AQP9	Acuaporina 9
ARF	“ADP-ribosylation factor”
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
	“ARF-GAP with SH3 domain, ankyrin repeat and
ASAP	PH domain”
ATP	Trifosfato de Adenosina
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina de suero bovino
BTK	Tirosina quinasa de Bruton
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
	Función de distribuciones de coeficientes
c(s)	de sedimentación
CBB	“Coomassie Brilliant Blue”
CBL	Lazo de unión al carboxilo
CBP	Proteína de unión a Calmodulina
CFP	“Cyan Fluorescent protein”
	Regulador de la Conductancia Transmembrana
CFTR	en la Fibrosis Quística
Co-IP	Co-inmunoprecipitación
Cpm	Centelleos por minuto
CRAC	Secuencia consenso de reconocimiento de colesterol
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DAG	Diacilglicerol
DDO	Medio mínimo de crecimiento de levaduras carente de triptófano y leucina
DDO/Aba100	DDO que contiene 100 ng/μl de Aureobasidina A
DDO/Aba125	DDO que contiene 125 ng/μl de Aureobasidina A
DDO/X/Aba100	DDO que contiene X-α-Gal y 100 ng/μl de Aureobasidina A

dHL60	Células HL60 diferenciadas a neutrófilos
DHPC	1,2-diheptanoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DLG	"Discs Large Tumor Suppressor"
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DOPA	Dioleil ácido fosfatídico
DQ	Dominio de actividad quinasa
DTT	Ditiotreitol
E	Eluidos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Buffer de elución
EBP50	"Ezrin-radixin-moesin-binding-phospho-protein-502"
EBP50 <sup>R40D</sup> , EBP50 <sup>K19D</sup>	Mutantes de EBP50 que no interactúan con PIP5KIβ
EDTA	Acido etildiaminotetraacético
EGTA	Etilenglicol-bis-(aminoetileter)tetra-acético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EluTEV	Proteína eluida de IgG por corte con TEV
ePC	Fosfatidilcolina de huevo
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
ESI-Q/TOF	"Electro-Spray Ionization Time-of-Flight"
ESM	Error estándar de la media
Ext	Extracto
F-Xa	Factor Xa
FAK	Quinasa de adhesión focal
FCS	Suero fetal de ternera
FDR	Tasa de falsos positivos
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
FRET	Transferencia de Energía de Resonancia de Forster
GAL4BD	Dominio de unión al ADN de GAL4
GAPs	"GTPase Activating Proteins"
GDP	Guanosina difosfato
GEFs	Guanine Nucleotide Exchange Factors
GFP	Proteína verde fluorescente
GST	Glutación S-transferasa
GTP	Guanosina trifosfato

HA	Hemaglutinina
HBS	"Hepes Buffered Saline"
HEPES	Ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
HRP	Peroxidasa de rábano
IB	"Inmunoblot"
Ins	Inserto
Insol	Insoluble
IP	Inmunoprecipitación
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido
L	Lavados
LA	Lazo de activación
LPA	Acido lisofosfatídico
m	Media
MALDI-TOF	"Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight"
	"Matrix-Assited Laser Desorption/Ionization
MALDI-TOFF/MS	Time-of-Flight Mass Spectrometry"
MBP	"Maltose Binding Protein"
MOI	Indice de multiplicidad de infección
	"Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding
MRCK	kinase"
MYLK2	Myosin Light Chain Kinase 2
N-terminal	Extremo amino terminal
nE	Proteína unida a resina de Calmodulina después de eluir
NHERF	"Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger regulatory factor"
nUCa	Proteína no unida a resina de Calmodulina
nUIgG	Proteína que no se une a IgG
P.I	Tiempos post-infección
P/S	Penicilina y estreptomicina
PA	Acido fosfatídico
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	"Protein Data Bank"
	Receptor del Factor de Crecimiento Derivado
PDGFR	de Plaquetas
	"Postsynaptic Density 95, PSD-85; Discs Large (Dlg)
PDZ	Zonula Occludens-1 (ZO-1)"

PEG	Polietilenglicol
PH	Dominio de homología a pleckstrina
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PI3P	PI-3-fosfato
PI4P	Fosfatidilinositol 4-fosfato
PI5P	Fosfatidilinositol 5-fosfato
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato
PIP3KIII	Fosfatidilinositol 3-fosfato 5-kinasas de tipo III
PIP4KII	Fosfatidilinositol 5-fosfato 4-kinasa de tipo II
PIP4KII $\beta$	Isoforma b de PIP4KII
PIP5K	Fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinasa
PIP5KI	Fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinasa tipo I
PIP5KI $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	Isoformas $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ PIP5KI
PIP5KI $\beta^{(-3)D/K}$	Mutante de PIP5KI $\beta$ que no interactúa con EBP50
	Mutante del N-terminal de PIP5KI $\beta$ que presenta las sustituciones
PIP5KI $\beta$ -F	(F64A/L65A/P66A)
	Mutante del N-terminal de PIP5KI $\beta$ que presenta las sustituciones
PIP5KI $\beta$ -L	(L35A/Y39A/N43A)
	Mutante del N-terminal de PIP5KI $\beta$ que presenta las sustituciones
PIP5KI $\beta$ -LF	(L35A/Y39A/N43A/F64A/L65A/P66A)
	Mutante del N-terminal de PIP5KI $\beta$ que presenta las sustituciones
PIP5KI $\beta$ -LP	(L35A/Y39P/N43A)
	Mutante del N-terminal de PIP5KI $\beta$ que presenta las sustituciones
PIP5KI $\beta$ -LPF	(L35A/Y39P/N43A/F64A/L65A/P66A)
	Mutante de PIP5KI $\beta$ que consiste en los primero 110 aminoácidos
PIP5KI $\beta\Delta$ 110	del N-terminal de PIP5KI $\beta$
	Mutante de PIP5KI $\beta$ que consiste en los primero 232 aminoácidos
PIP5KI $\beta\Delta$ 232	del N-terminal de PIP5KI $\beta$
	Mutante de PIP5KI $\beta$ que consiste en los primero 318 aminoácidos
PIP5KI $\beta\Delta$ 318	del N-terminal de PIP5KI $\beta$
	Mutante de PIP5KI $\beta$ que carece los primero aminoácidos 34 al 110
PIP5KI $\beta\Delta$ 34-110	del N-terminal de PIP5KI $\beta$
	Mutante de PIP5KI $\beta$ que carece de los últimos 83 aminoácidos
PIP5KI $\beta\Delta$ 456	del C-terminal de PIP5KI $\beta$

PIP5KI $\gamma$ _i2	Variante de “splicing” de PIP5KI $\gamma$
PIP5KI $\gamma$ -D235A	Mutante de PIP5KI $\gamma$ catalíticamente inactivo
PIP5KI $\gamma$ -W642F	Mutante de PIP5KI $\gamma$ que no se une a Talina
PIPK	Fosfatidilinositol-fosfato-quinasas
PK	Proteínas quinasas
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PLC-b2	Fosfolipasa-C-b2
PLD	Fosfolipasa D
PMSF	"Phenylmethysulfonyl fluoride"
PSD-95	Postsynaptic density protein 95
PTHR	Receptor de la Hormona Paratiroidea
QDO	Medio mínimo de crecimiento de levaduras carente de triptófano, leucina, adenina e histidina
QDO/Aba100	QDO que contiene 100 ng/ $\mu$ l de Aureobacidina A
QDO/X/Aba100	QDO que contiene X- $\alpha$ -Gal y 100 ng/ $\mu$ l de Aureobacidina A
RB	Tampón de resuspensión
Rf	Factor de retención
RMSD	Desviaciones cuadráticas medias
	Raíz cuadrada del promedio de la distancia entre los
RMSDs	átomos al superponer dos estructuras
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
s	Coefficiente de sedimentación
SB	Tampón de solubilización
SDO/-Leu	Medio mínimo de crecimiento de levaduras carente de leucina
SDO/-Trp	Medio mínimo de crecimiento de levaduras carente de triptófano
SDS	Dodecil-sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamina
Sg-ECL	Super-Signal ELISA Pico
SN	Sobrenadante
Sol	Soluble
TA	Temperatura ambiente
TAP	"Tandem Affinity Purification"
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA
TBS	Tampón Tris-Borato-Salino

TC	Tinción de Coomassie
TEV	Virus del Mosaico del Tabaco
TLC	Cromatografía de capa fina
Total	Tot
TX-100	Tritón X-100
UA	Unidades Arbitrarias
UCa	Proteína unida a Calmodulina
UIgG	Proteína unida a resina IgG
UIgGTEV	Proteína unida a resina de IgG tras corte con TEV
UN	No unido
UR	Unidades relativas
UV	Ultravioleta
WB	Tampón de lavado
YFP	Yellow fluorescent protein
YTH	Sistema de Dobles Híbridos en Levaduras
ZO-1	Zonula Ocludens
$\beta$ 2AR	Receptor $\beta$ 2-Adrenérgico
$\beta$ 2AR	Receptor Adrenérgico $\beta$ -2
$\pi_c$	Presión crítica lateral
$\pi_s$	Presión de saturación



# Introducción



## 1.Introducción

### 1.1. Las fosfatidilinositol 4-fosfato-5-quinasas de tipo I (PIP5KI).

#### 1.1.1 El fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2).

La familia de los fosfoinosítidos consta de siete derivados del fosfatidilinositol (PI) que se sintetizan a través de la fosforilación de las posiciones D-3, -4 y -5 del anillo de inositol. Estos fosfolípidos regulan una gran variedad de procesos celulares a pesar de que se encuentran en muy pequeñas cantidades en la membrana plasmática. El fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP2) ha sido uno de los fosfoinosítidos más estudiados por su papel central en la señalización celular. Inicialmente se pensó que el PIP2 no era más que el sustrato de dos enzimas, la fosfolipasa C (PLC), que genera inositol (1,4,5)-trifosfato y diacilglicerol (DAG) (Hokin, 1969, 1985; Jafferji and Michell, 1976) y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que produce PI(3,4,5)-trifosfato (PIP3). Posteriormente se vio que el PIP2 también actúa como segundo mensajero (Anderson and Marchesi, 1985; Janmey and Stossel, 1987; Lassing and Lindberg, 1985) y actualmente se conocen cientos de proteínas que interaccionan con el PIP2 y son efectores en determinadas vías de señalización. Estas proteínas se localizan en diversos compartimientos celulares y median procesos como la adhesión celular (Janmey and Stossel, 1987), los cambios en el citoesqueleto (Ling et al., 2006), la polarización y la migración celular (Lacalle et al., 2007; Ling et al., 2007; Ling et al., 2002; Mañes et al., 2010; Thapa and Anderson, 2012), la secreción y el tráfico vesicular (Downes et al., 2005; Hay et al., 1995; Martin, 2001), la regulación de los canales iónicos (Delmas et al., 2005), la señalización nuclear y la expresión génica (Barlow et al., 2010; Mellman et al., 2008).

Las enzimas encargadas de la síntesis del PIP2 se aislaron inicialmente de eritrocitos como dos isoformas (tipo I y tipo II) de la fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinasa (PIP5K) con diferentes propiedades bioquímicas (Bazenet et al., 1990). La  $K_m$  de la de tipo I (PIP5KI) resultó ser 20 veces menor que la de tipo II y su actividad era estimulada por ácido fosfatídico (PA), heparina y espermina (Loijens and Anderson, 1996). Posteriormente al examinar en detalle su especificidad de sustrato se encontró que la isoforma tipo II fosforilaba el fosfatidilinositol 5-fosfato (PI5P) en posición D-4, y por tanto era una fosfatidilinositol 5-fosfato 4-quinasa de tipo II (PIP4KII) (Rameh et al., 1997). Así, dos familias de enzimas sintetizan el PIP2, las PIP5KI que fosforilan el fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P) en posición D-5 del anillo de inositol, y las PIP4KII que fosforilan el PI5P en posición D-4. Las PIP5KI pueden fosforilar además del PI4P, aunque en mucha menor proporción, el PI, el PI(3,4) bifosfato en posición D-5 (Halstead et al., 2001) y el PI-3-fosfato (PI3P) (Tolias et al., 1998; Zhang et al., 1997), si bien en mamíferos las fosfatidilinositol 3-fosfato 5-quinasas de tipo III

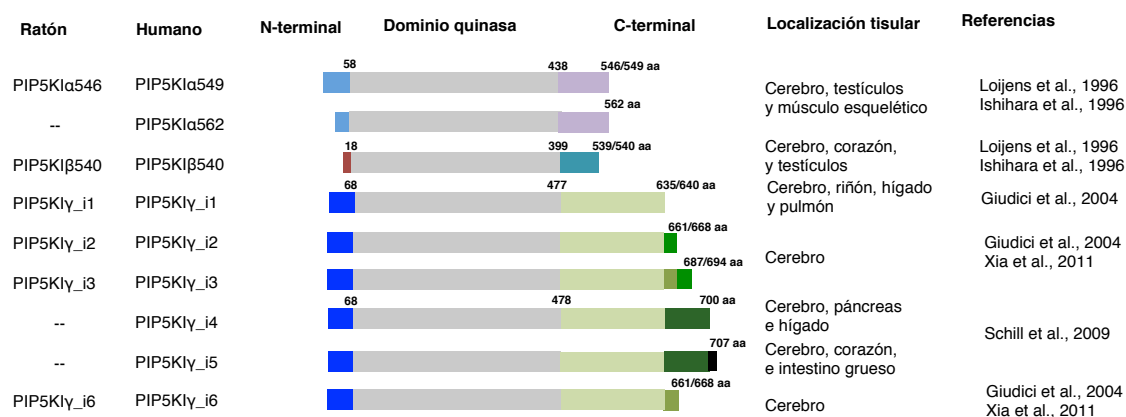
(PIP3KIII) también pueden fosforilar el PI3P en posición D-5 (Gary et al., 1998; Sbrissa et al., 1999).

El empleo de fósforo radioactivo ( $^{32}\text{P}$ ) en neutrófilos ó en células 3T3 y la posterior determinación de la tasa de marcaje de la posición D-4 con relación a D-5 sugirió que la vía fundamental de síntesis de PIP2 está mediada por las PIP5KI (Stephens et al., 1991; Whiteford et al., 1997), lo cual concuerda con los bajos niveles de PI5P (~2% del total de fosfoinosítidos monofosfato y ~10 veces menos que PI4P) (Divecha, 2010; Rameh et al., 1997).

### 1.1.2. Isoformas, variantes de splicing y localización subcelular de las PIP5KI.

Se conocen 3 isoformas de PIP5KI (PIP5KI $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) (Ishihara et al., 1998; Loijens and Anderson, 1996). Debido a que fueron clonados simultáneamente por diferentes grupos, las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  se nombraron de manera opuesta entre humano y ratón (PIP5KI $\alpha$  humana es similar a PIP5KI $\beta$  de ratón y viceversa); actualmente se usa la terminología correspondiente a las isoformas humanas. Las PIP5KI poseen una región central muy conservada con actividad catalítica. Las regiones N- y C-terminales divergen en su secuencia y son específicas para cada isoforma y variante de “splicing” (Fig. 1). Generalmente el “splicing” en estas proteínas tiene lugar en exones que codifican aminoácidos (aa) para la región C-terminal. La nomenclatura de las variantes de “splicing” también ha sido algo confusa y una misma variante se ha nombrado de diversas formas. Recientemente se ha propuesto denominar las variantes de la PIP5KI $\gamma$  de acuerdo a lo recomendado por el Comité de Nomenclatura Genética de la “Human Genome Organization” (HUGO) (Schill and Anderson, 2009).

Las PIP5KI $\alpha$ 546, PIP5KI $\beta$ 539, PIP5KI $\gamma$ \_i1, PIP5KI $\gamma$ \_i2, PIP5KI $\gamma$ \_i3 y PIP5KI $\gamma$ \_i6 murinas son ortólogos de las variantes humanas PIP5KI $\alpha$ 549, PIP5KI $\beta$ 540, PIP5KI $\gamma$ \_i1, PIP5KI $\gamma$ \_i2, PIP5KI $\gamma$ \_i3 y PIP5KI $\gamma$ \_i6, respectivamente (Fig. 1). No se ha encontrado un ortólogo murino de las variantes humanas PIP5KI $\alpha$ 562, PIP5KI $\gamma$ \_i4 y PIP5KI $\gamma$ \_i5 (Giudici et al., 2004; Ishihara et al., 1996; Ishihara et al., 1998; Loijens and Anderson, 1996; Schill and Anderson, 2009; Xia et al., 2011).



**Figura 1. Las PIP5KI y sus variantes de “splicing”.** Esquema de las isoformas y variantes de splicing descritas de PIP5KI y su distribución por tejidos. Se colorean diferencialmente la región central (dominio quinasa) y los segmentos específicos de las regiones N- y C-terminal. Los números indican los límites de los dominios en las secuencias así como su longitud en aminoácidos (aa) (murino/humano). Se muestran las variantes cuya existencia ha sido comprobada experimentalmente.

La visualización de las proteínas endógenas es difícil y no siempre ha sido posible. A pesar de ello se ha estudiado la distribución por tejidos (Fig. 1) y la localización subcelular (muy heterogénea) de las variantes de “splicing” de las distintas isoformas de PIP5KI. PIP5KIα549 se localiza en protrusiones de la membrana plasmática conocidas como “ruffles”, inducidas por la GTPasa Rac en fibroblastos (Doughman et al., 2003b); mientras que PIP5KIα562 se encuentra en estructuras denominadas “nuclear speckles” o manchas nucleares en el núcleo de células HeLa (Boronenkov et al., 1998; Mellman et al., 2008). PIP5KIβ540 se localiza en la membrana plasmática de fibroblastos, así como en vesículas en la región perinuclear (Doughman et al., 2003a). PIP5KIγ<sub>i1</sub> se encuentra en la membrana plasmática en diversos tipos celulares (Di Paolo et al., 2002; Ling et al., 2002) y PIP5KIγ<sub>i2</sub> en los contactos focales y en las uniones adherentes de células epiteliales (Di Paolo et al., 2002; Ling et al., 2007; Ling et al., 2002). PIP5KIγ<sub>i3</sub> parece estar asociada a vesículas endosomales tanto en células COS-7 como en HEK-293T (Giudici et al., 2006), mientras que PIP5KIγ<sub>i4</sub> se encuentra en los “speckles” nucleares y en menor cuantía en el citoplasma de células MCF10 y HeLa (Schill and Anderson, 2009). PIP5KIγ<sub>i5</sub> se localiza en la membrana plasmática y en vesículas endosomales de células HeLa donde interacciona a través de su dominio quinasa con N-cadherina (Schill and Anderson, 2009). PIP5KIγ<sub>i6</sub> se encuentra en la membrana plasmática de células COS-7 (Xia et al., 2011). La localización específica de las isoformas de PIP5KI en distintos compartimentos intracelulares sugiere que las diversas variantes pueden estar implicadas en la generación local de PIP2, lo cual contribuiría al desarrollo de procesos

biológicos concretos en regiones celulares específicas (Anderson et al., 1999; Coppolino et al., 2002; Doughman et al., 2003a; Heck et al., 2007).

Aunque la visualización de las diferentes isoformas de PIP5KI endógenas sugiere que se localizan en diferentes regiones a nivel subcelular, la sobreexpresión de las PIP5KI causa su localización fundamentalmente en la membrana plasmática. El efecto de la sobreexpresión en la localización no se comprende del todo; se piensa que podría estar relacionado con un incremento en los niveles del PIP2 en la membrana (van den Bout and Divecha, 2009). El hecho de que los mutantes catalíticamente inactivos de la PIP5KI $\gamma$ \_i3 se localicen en el citosol de células HEK-293T (Giudici et al., 2006; van den Bout and Divecha, 2009), está de acuerdo con la idea de que su localización subcelular está relacionada con la producción de PIP2. Sin embargo, mutantes catalíticamente inactivos de PIP5KI $\gamma$ \_i2 humana sobreexpresados en estas células también se localizan en la membrana (Giudici et al., 2006).

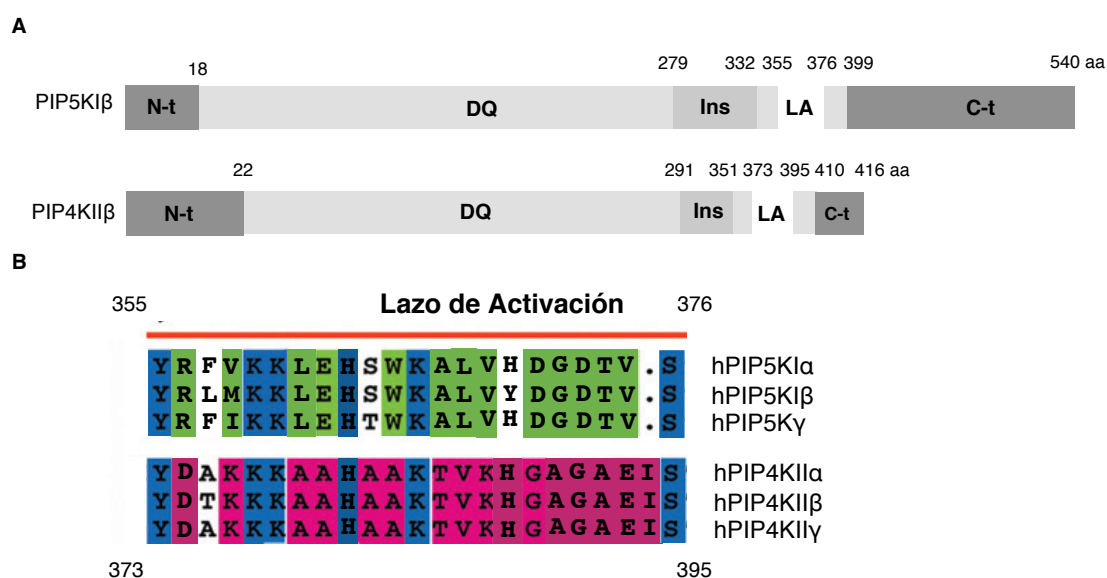
## 1.2. Dominios funcionales de las PIP5KI.

Las fosfatidilinositol-fosfato-quinasas (PIPK) de tipo I y II presentan una organización similar: un dominio central con actividad quinasa (DQ), y regiones N- y C-terminales menos conservadas e implicadas en la interacción con otras proteínas (Fig. 2A). El DQ de las PIP5KI posee ~80% de identidad de secuencia entre las isoformas de una misma subfamilia (Sun, 2013), y tiene residuos altamente conservados implicados en la interacción con ATP, GTP ó  $Mg^{2+}$  y el reconocimiento específico del sustrato lipídico (Doughman et al., 2003a; Kunz et al., 2000; Rao et al., 1998).

### 1.2.1. El dominio quinasa y la especificidad de sustrato.

El DQ comprende la región central y constituye la mayor parte de la secuencia de las PIPK. En este dominio tiene lugar la transferencia del grupo  $\gamma$ -fosfato de alta energía del ATP ó el GTP al grupo 5-hidroxilo del PI4P para generar el PIP2. Dentro del DQ se encuentra una secuencia de unos 22 aa equivalente al denominado lazo de activación (LA) de las proteínas quinasas (PK) (Cox et al., 1994) (Fig. 2), implicada en el reconocimiento específico del sustrato, y una región poco conservada entre las PIP5KI de unos 53 aa conocida como inserto (Ins) que se encuentra desordenada en la estructura de PIP4KII $\beta$  (Rao et al., 1998). Tres residuos altamente conservados dentro del DQ de las PIPK (K138, D266 y D350 en PIP5KI $\beta$ ) parecen jugar un papel muy importante en la reacción de transferencia del grupo fosfato catalizada por estas enzimas de acuerdo con la estructura de PIP4KII $\beta$  (Rao et al., 1998). La K138 interactuaría, en presencia de iones  $Mg^{2+}$  con los grupos  $\alpha$  y  $\beta$  fosfatos del ATP que no se transfieren, el D266 actuaría como una base débil en la catálisis y el D350 interactuaría con los iones  $Mg^{2+}$  del complejo  $Mg^{2+}$ -ATP.

Los determinantes moleculares de la especificidad de sustrato en las PIP5KI y PIP4KII fueron identificados inicialmente por Kunz y colaboradores (Kunz et al., 2002; Kunz et al., 2000) como una secuencia de 25 aa, hacia la región C-terminal del DQ. Esta secuencia en la estructura de las PIP4KII se corresponde con el llamado lazo de activación (LA) de las proteínas quinasas (Rao et al., 1998). Aunque el LA se encuentra desordenado en la estructura cristalográfica de PIP4KII $\beta$  (Rao et al., 1998), juega un importante papel en la función de estas quinasas. Su secuencia se encuentra muy conservada dentro de cada subfamilia de PIPK, pero varía de una subfamilia a otra lo cual sugirió que el LA estaría implicado en el reconocimiento y/o el acomodo del sustrato en el sitio catalítico (Fig. 2B).



**Figura 2. Organización en dominios de las PIPK.** (A) Representación esquemática de PIP5KI $\beta$  y PIP4KII $\beta$  humanas. Los números indican los límites de cada dominio así como la longitud de la secuencia. El DQ presenta gran similitud entre las isoformas de una misma subfamilia. Dentro de este dominio se encuentra el inserto (Ins) y el lazo de activación (LA). (B) Alineamiento de secuencias del LA de las PIPK de tipo I y II humanas. Los residuos totalmente conservados entre todas las PIPK se muestran en azul; en verde y rosa se indican los conservados en cada tipo de proteínas.

Mediante la construcción de quinasas quiméricas intercambiando los LA de las PIP5KI y PIP4KII, Kunz y colaboradores (Kunz et al., 2000) demostraron que la PIP5KI $\beta$  que tenía el LA de la PIP4KII $\beta$  cambiaba su especificidad de sustrato y se comportaba como una PIP4KII $\beta$  localizándose además en el citosol celular. Por el contrario, la PIP4KII $\beta$  que tenía el LA de la PIP5KI $\beta$  se localizaba en la membrana plasmática y se comportaba como una PIP5KI $\beta$ . Mutaciones en el LA de PIP5KI $\beta$  y PIP4KII $\beta$  demostraron que la especificidad de sustrato y la localización en la membrana dependía del aminoácido PIP5KI $\beta$ (E362) y PIP4KII $\beta$ (A381), respectivamente (Kunz et al., 2002).

Todas las isoformas de PIP5KI contienen tres lisinas en el LA (en PIP5KI $\beta$  K399/K400/K406) (Fig. 2B), que constituyen un parche de aminoácidos básicos similar al encontrado en los dominios PH (“Pleckstrin homology”) y FYVE (Fab1-YOTB-Vac1-EEA1) que interaccionan con fosfoinosítidos (Shao et al., 2007; Wurmser et al., 1999). Los residuos con carga positiva podrían jugar un papel importante en la unión a membrana, ya que la mutagénesis del motivo dilisina en PIP5KI $\beta$  (K399N/K400N) provoca la pérdida de la localización en la membrana y una disminución de la afinidad de los mutantes por el sustrato de 3 veces con relación a la enzima nativa (Kunz et al., 2000). Esto sugiere que la especificidad de sustrato y la localización subcelular de las PIPKI están condicionadas por residuos dentro del LA. Sin embargo, que la distribución subcelular de las isoformas de PIP5KI sea diferente a pesar de la homología de sus LA, indica la implicación de otras regiones de estas proteínas en su localización dentro de la célula.

### **1.2.2 Regulación de la localización y actividad de las PIP5KI por los dominios N- y C-terminal.**

Los dominios N- y C-terminales de las PIP5KI difieren significativamente en su secuencia entre las isoformas y las variantes de splicing de PIP5KI. Existen numerosos ejemplos de que la diversidad en el N- y C-terminal permite a las isoformas de PIP5KI interactuar de forma específica con proteínas de señalización. En ocasiones dichas interacciones determinan la distribución subcelular y la actividad de estas quinasas (Di Paolo et al., 2002; Heck et al., 2007; Lacalle et al., 2007; Ling et al., 2002; Mañes et al., 2010). Esto confiere una especificidad en la función de cada isoforma, no tanto por su actividad enzimática (que es similar para todas ellas), sino por localizar temporal y espacialmente la producción de PIP2. A continuación se muestran algunos ejemplos las interacciones que pueden regular la función de las PIP5KI.

#### *1.2.2.1. Función de la PIP5KI $\gamma_2$ en la adhesión celular.*

Uno de los ejemplos mejor caracterizados del papel crítico del C-terminal en la especificidad funcional de las isoformas de PIP5KI, lo constituye la interacción de PIP5KI $\gamma_2$  con el dominio FERM de Talina, lo que permite la localización de la quinasa en los contactos focales. Talina es una proteína adaptadora que interacciona con el dominio citoplasmático de las integrinas y modifica la afinidad de éstas por sus ligandos (Smith et al., 2005). La interacción del FERM de Talina tiene lugar a través del motivo WVYSPL dentro de los últimos 28 aminoácidos específicos del C-terminal de PIP5KI $\gamma_2$  (Di Paolo et al., 2002; Lee et al., 2005; Ling et al., 2002). La localización de Talina en los contactos focales depende de su interacción con las  $\beta$ -integrinas;



PIP5KI $\gamma$ i\_2 regula negativamente la interacción entre Talina y las  $\beta$ -integrinas debido a que comparte con estas últimas el mismo sitio de unión en el dominio FERM de Talina (Barsukov et al., 2003). La fosforilación de PIP5KI $\gamma$ i\_2 en Y649/Y650 regula su interacción con Talina, controlando el ensamblaje y desensamblaje de los contactos focales (Lee et al., 2005; Ling et al., 2003).

Por otra parte PIP5KI $\gamma$ i\_2, en células epiteliales, interacciona con las regiones citoplasmáticas de los dímeros de E-Caderina y con la subunidad  $\mu$ 1 del complejo adaptador del tráfico vesicular AP1B (Ling et al., 2007). La interacción con  $\mu$ 1 que tiene lugar dentro de los últimos 26 aa del C-terminal de la PIP5KI $\gamma$ i\_2 incrementa la actividad quinasa de PIP5KI $\gamma$ i\_2 y favorece el tráfico de E-Caderina hacia la región basolateral de la membrana plasmática. La PIP5KI $\gamma$ i\_2 actúa como una proteína adaptadora y mediante la síntesis de PIP2, como reguladora del tráfico de E-Caderina (Ling et al., 2007).

A través de su región C-terminal, PIP5KI $\gamma$ i\_2 interacciona con la subunidad  $\beta$ 2 del complejo de proteínas adaptadoras AP2. Esta interacción incrementa la actividad quinasa, lo cual a su vez estimula la endocitosis dependiente de clatrina en la sinápsis de las neuronas del hipocampo (Nakano-Kobayashi et al., 2007).

#### 1.2.2.2. Cross-comunicación entre las PIP5KI y las Rho GTPasas .

Las GTPasas de la familia Rho (RhoA, Rac1 y Cdc42) regulan la organización del citoesqueleto de actina (Etienne-Manneville and Hall, 2002) y activan a las PIP5KI; sin embargo solamente RhoA y Rac1 interaccionan de manera directa con el extremo N-terminal de las tres isoformas de PIP5KI, tanto *in vitro* como *in vivo* (Oude Weernink et al., 2004; van Hennik et al., 2003). En concordancia con esto, la región C-terminal (22 aa) de RhoA y Rac1 interacciona con las PIP5KI en ensayos de “GST-pulldown” en células HL60 (van Hennik et al., 2003). La interacción es independiente de la unión de las GTPasas a GTP ó GDP, y estimula la síntesis de PIP2 por las PIP5KI (Gratacap et al., 2001; Oude Weernink et al., 2000; Yamamoto et al., 2001). La activación de las PIP5KI por RhoA requiere la presencia del efector de RhoA, ROCK (“p160-Rho-associated coil-containing protein kinase”). La activación de las PIP5KI por Cdc42 y Rac1 es independiente tanto de RhoA como de ROCK (Oude Weernink et al., 2004).

Por otra parte existen evidencias de que las PIP5KI podrían ser activadas directamente por RhoA independientemente de ROCK (Matsui et al., 1999). La familia de proteínas ERM (“Ezrin-Radixin-Moesin”), en su forma activa, sirven de puente entre los dominios citoplasmáticos de algunas proteínas transmembranas y los filamentos de actina del el citoesqueleto (Bretscher et al., 2002). La sobre-expresión en células NIH3T3 de una forma constitutivamente activa de RhoA provoca la fosforilación, y por tanto la

activación, de las ERM independientemente de la co-expresión del inhibidor específico de ROCK Y-27632 (Matsui et al., 1999). La sobreexpresión en estas células de PIP5KI $\alpha$ , es suficiente para inducir la fosforilación de las ERM y la consecuente formación de “microvilli”. Todo lo anterior sugiere que PIP5KI $\alpha$  podría ser un efector directo de RhoA independientemente de la señalización de ROCK.

La interacción de Rac1 con las PIP5KI ocurre a través del motivo de aminoácidos básicos R185/K186/R187 en el C-terminal de la GTPasa (Tolias et al., 2000; van Hennik et al., 2003). Las mutaciones en este motivo impiden la interacción de Rac1 con PIP5KI $\alpha$ , lo cual disminuye la polimerización de actina inducida por Rac1 en plaquetas (Tolias et al., 2000) y provoca la inhibición parcial de la quimiotaxis en células HL60 estimuladas con la quimioquina SDF-1 $\alpha$  (van Hennik et al., 2003). Por otro lado la interacción con Rac1 es suficiente para localizar la PIP5KI $\beta$  en la membrana de células de neuroblastoma N1E-115. La síntesis de PIP2 en la membrana de estas células regula la localización de Vinculina y el desensamblaje de los contactos focales durante la retracción de las neuritas (Halstead et al., 2010).

#### 1.2.2.3. Interacción entre las PIP5KI y las ARF GTPasas.

La familia de las pequeñas GTPasas ADP-ribosylation factor (ARF) consta de 6 proteínas (ARF1-6), que se clasifican en 3 clases de acuerdo a su homología de secuencia (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). La clase I comprende las ARF1-3, la clase II ARF-4 y ARF-5 y la clase III ARF-6. Las ARF de las clases I y II se localizan fundamentalmente en el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi e intervienen en el tráfico intracelular de vesículas (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006; Perez-Mansilla et al., 2006). ARF6 se localiza en la membrana plasmática y está implicada en la endocitosis, exocitosis, el reciclaje de vesículas endosomales y en la reorganización del citoesqueleto de actina (Hernandez-Deviez et al., 2004; Krauss et al., 2003; Lawrence and Birnbaum, 2003; Tomas et al., 2010).

*In vitro* todas las isoformas de ARF inducen la actividad enzimática de PIP5KI $\beta$ , aunque se desconoce si interaccionan directamente (Honda et al., 1999). Sin embargo *in vivo* se ha visto que determinadas isoformas de PIP5KI son activadas por diferentes isoformas de ARF dependiendo del estímulo y del tipo celular. Por ejemplo, ARF6 (pero no ARF1 ni ARF5) activa a la PIP5KI $\beta$  induciendo protrusiones de membrana (“ruffles”) en respuesta a EGF en células HeLa (Honda et al., 1999). ARF1 puede activar la PIP5KI $\beta$  en el complejo de Golgi de células COS-7 y en membranas de células HL60 permeabilizadas (Jones et al., 2000; Skippen et al., 2002).

Como GTPasas que son, las ARF varían cíclicamente entre una forma activa (ARF-GTP), capaz de unir e hidrolizar el GTP y otra inactiva (ARF-GDP), unida al GDP que resulta de la hidrólisis del GTP. La forma activa de ARF6 (ARF6-GTP) recluta el complejo de proteínas adaptadoras (AP)2 y Clatrina a las membranas presinápticas de las neuronas, mediante el incremento local de PIP2 que resulta de la activación de PIP5KI $\gamma$ \_i2 por ARF6-GTP (Krauss et al., 2003). En neutrófilos, el transporte de vesículas dependiente de ARF6, estimulado por la adhesión mediada por integrinas, facilita la polarización de PIP5KI $\gamma$ \_i2 asociada a AP2 independientemente de la estimulación por los quimioatrayentes (Xu et al., 2010). La polarización de PIP5KI $\gamma$ \_i2 inducida por integrinas juega un importante papel en la polarización y la infiltración de los neutrófilos *in vivo* mediante la regulación de la localización y activación de RhoA (Xu et al., 2010).

Dos tipos de proteína regulan la actividad de las ARFs: las ARF-GAPs (“GTPase Activating Proteins”) que promueven la hidrólisis del GTP, y las ARF-GEFs (“Guanine Nucleotide Exchange Factors”) que facilitan el intercambio del GDP por una nueva molécula de GTP. Ambas proteínas (ARF-GAPs y ARF-GEFs) tienen dominios pleckstrina (PH) a través de los cuales pueden interaccionar con PIP2 y promover su activación (Kam et al., 2000; Klarlund et al., 1998; Nie et al., 2002).

### **1.3. La interacción de PIP5KI $\beta$ con proteínas con dominios PDZ.**

#### **1.3.1. Características de los dominios PDZ.**

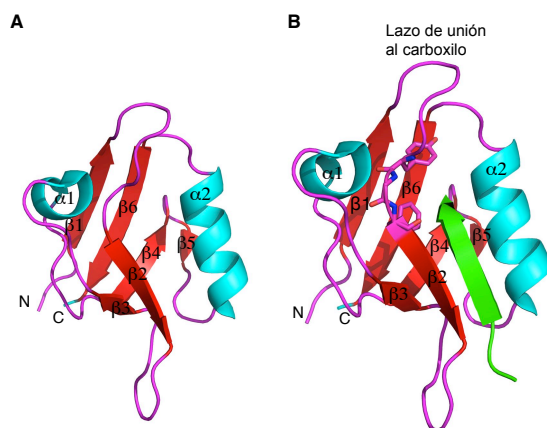
Los dominios PDZ son motivos de interacción proteína-proteína, generalmente distribuidos como repeticiones modulares en las proteínas adaptadoras capaces de ensamblar complejos multiproteicos (Mamonova et al., 2012). La proximidad de los interactuantes en estos complejos se ve favorecida por la disposición modular de los PDZ en las proteínas adaptadoras (Good et al., 2011). El nombre PDZ deriva de las 3 proteínas en las cuales fueron identificados originalmente: “Postsynaptic Density Protein 95 (PSD-95)”, “Discs Large Tumor Suppressor (DLG)” y “Zonula Ocludens (ZO-1) (Cho et al., 1992; Kim et al., 1995; Woods and Bryant, 1993). Se han identificado unos 270 dominios de este tipo en 150 proteínas humanas (Luck et al., 2012; Tonikian et al., 2008).

En general, los PDZ reconocen secuencias cortas en el extremo C-terminal de las proteínas con las que interaccionan (Harris and Lim, 2001; Jemth and Gianni, 2007), aunque también pueden reconocer motivos peptídicos internos (Hillier et al., 1999; Hurd et al., 2003; London et al., 2004; Wong et al., 2003) o unirse entre si formando homo ó heterodímeros (Fouassier et al., 2000; Lau and Hall, 2001; Morales et al., 2007; Xu et al., 1998). Los ligandos

más frecuentes de las proteínas con dominios PDZ son receptores acoplados a proteínas G, receptores tirosina quinasa y canales iónicos. Existe una elevada promiscuidad en las interacciones y un mismo PDZ puede reconocer varios ligandos; un ligando también puede ser reconocido por varios de estos dominios (Mortier et al., 2005).

Los dominios PDZ constan de una secuencia de aproximadamente 80-90 aa y adoptan un plegamiento que es común en las casi 300 estructuras depositadas en la base de datos PDB (Protein Data Bank) (Chi et al., 2012; Daniels et al., 1998; Doyle et al., 1996; Kozlov et al., 2000; Luck et al., 2012; Ye and Zhang, 2013). La estructura consiste en un sándwich o barril de 5 ó 6 láminas  $\beta$ , flanqueado por dos  $\alpha$ -hélices. Una de las dos láminas que componen el sándwich comprende las hebras  $\beta 1$ ,  $\beta 6$  y  $\beta 5$  y la otra  $\beta 2$  y  $\beta 3$ , ambas láminas comparten la hebra  $\beta 4$  (Fig. 3A). Los extremos N- y C-terminales generalmente se encuentran muy cerca y en ocasiones se entrelazan evitando la apertura del barril  $\beta$ . El interior del barril  $\beta$  está constituido por residuos generalmente hidrofóbicos mientras el exterior de la estructura es más bien hidrofílico. La hebra  $\beta 2$  se sitúa paralela a la hélice  $\alpha 2$  formando una cavidad o bolsillo de unión a péptidos (Luck et al., 2012).

Entre las hebras  $\beta 1$  y  $\beta 2$  se encuentra el llamado lazo de unión al carboxilo (CBL), altamente conservado en la mayoría de los PDZ (Amacher et al., 2013; Tonikian et al., 2008). En esta secuencia (R/K-XXX-G- $\phi$ -G- $\phi$ , donde X es cualquier aminoácido y  $\phi$  un residuo hidrofóbico) la segunda glicina se encuentra muy conservada, mientras que la primera es sustituida, en ocasiones, por S o T (Tonikian et al., 2008). La conformación del CBL, ligeramente enrollado hacia la izquierda, dispone los hidrógenos amida de los tres últimos residuos del motivo G- $\phi$ -G- $\phi$  directamente hacia los oxígenos del grupo carboxilato del último residuo en el C-terminal del péptido y constituye la base estructural para el reconocimiento, por parte de los dominios PDZ, de los péptidos con carboxilo libre en el extremo C-terminal (Fig. 3B).



**Figura 3. Plegamiento en forma de barril de los dominios PDZ.** Representación en diagrama “cartoon” del (A) PDZ1 de la proteína adaptadora PDZK1 (PDB: 4F8K), y (B) PDZ1 de PDZK1 en interacción con los últimos 7 aminoácidos del receptor de prostaciclina I2 (PDB: 4F8K). Se muestran y numeran los elementos de estructura secundaria (cyan: hélices  $\alpha$ , rojo: hebras  $\beta$ ); el péptido se representa en verde. Se señalan el CBL y los residuos del motivo YGF con sus grupos amidas (en azul) dispuestos hacia el carboxilo de la L0 del péptido,

Recientemente se han descrito elementos de estructura secundaria que pueden extender los dominios PDZ más allá de la región de 80-90 aa habituales (Wang et al., 2010). En el caso de EBP50, se han encontrado dos hélices adicionales ( $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ ) separadas por un lazo hacia la región C-terminal del PDZ2 que forman parte de la estructura del dominio mediante interacciones con residuos hidrofóbicos de las hebras  $\beta 1$ ,  $\beta 4$  y  $\beta 6$ . Estas hélices se encuentran distantes del sitio de unión al ligando en los dominios PDZ y contribuyen, alostéricamente, a aumentar la estabilidad termodinámica y la afinidad del PDZ2 por sus ligandos (Bhattacharya et al., 2010).

A partir del análisis de secuencia se determinó que la extensión del dominio PDZ2 se encontraba también presente en el PDZ1 de EBP50 y que se conserva en los PDZ de la familia de proteínas “ $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger regulatory factor” (NHERF) a la que pertenece EBP50. Lo anterior sugiere la importancia de estos elementos adicionales de estructura secundaria en la función de los PDZ de esta familia.

Generalmente se considera que los últimos 4 aa son los implicados en la interacción con los residuos del bolsillo de unión del PDZ, aunque se plantea que hasta la posición -7 puede contribuir a la unión (Cheng et al., 2009; Tonikian et al., 2008). Los aminoácidos de los péptidos que interaccionan con los PDZ se numeran de manera que el último residuo es el 0, el penúltimo el -1, y así sucesivamente. La mayoría de los péptidos que interaccionan con los dominios PDZ lo hacen situándose, como una hebra adicional a la hebra  $\beta 2$ , mediante interacciones entre las cadenas principales de sus residuos, en un fenómeno conocido como “ $\beta$ -sheet augmentation” (Daniels et al., 1998; Doyle et al., 1996; Luck et al., 2012; Tonikian et al., 2008) (Fig. 3B). Sin embargo, en ocasiones, como en algunas de las interacciones del PDZ1 de la Syntenina-1 (Grembecka et al., 2006), la Tamalina (Sugi et al., 2007), o el PDZ1 de EBP50 (Karthikeyan et al., 2001a), se ha visto que los péptidos se insertan perpendiculares a la hebra  $\beta 2$  y solamente interaccionan con el PDZ a través de 2 de los últimos residuos del extremo C-terminal.

Los dominios PDZ se dividieron originalmente en tres tipos, de acuerdo con las características de los aminoácidos en los péptidos con los que interaccionan. El tipo I reconoce péptidos C-terminales con la secuencia X[T/S]X $\phi$ -COOH, donde X es cualquier aminoácido y  $\phi$  un residuo hidrofóbico, el tipo II reconocería secuencias X $\phi$ X $\phi$ -COOH. Un tercer tipo, menos frecuente que los dos anteriores, reconoce péptidos X[D/E]X $\phi$ -COOH (Songyang et al., 1997; Stricker et al., 1997). Estudios posteriores, sin embargo han demostrado que los cuatro residuos del péptido contribuyen a la afinidad a través de múltiples contactos con los residuos del PDZ (Reina et al., 2002; Tonikian et al., 2008). Estas interacciones pueden implicar incluso residuos hasta en la posición -7 del péptido y extensiones del lazo  $\beta$ 2- $\beta$ 3 (Balana et al., 2011; Birrane et al., 2003; Kozlov et al., 2002) y la hélice  $\alpha$ 2 del PDZ (Feng et al., 2008). A partir de la identificación y el análisis de las secuencias de 10.000 péptidos detectados como interactuantes de 82 dominios PDZ, se han definido 16 clases de estos dominios atendiendo a su especificidad (Tonikian et al., 2008). Estos resultados mostraron que los dominios PDZ no son tan promiscuos como se pensaba, si no que más bien seleccionan entre una gran variedad de interactuantes según su especificidad.

### **1.3.2. PIP5KI $\beta$ interacciona con los PDZ de EBP50. Efecto en polarización y migración de leucocitos.**

Para moverse en una dirección determinada, las células necesitan establecer una asimetría espacial y funcional; este proceso se conoce como polarización celular (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Morfológicamente, en una célula polarizada se distinguen dos regiones, el frente de avance y la zona posterior, llamada urópodo en leucocitos. El frente de avance se extiende en forma de lamelipodio en la dirección del movimiento y es rico en actina, mientras que el urópodo se retrae durante el movimiento por la contracción actina/miosina (del Pozo et al., 1999; Vicente-Manzanares et al., 1999). La polarización conlleva la reorganización de determinadas moléculas como proteínas de adhesión, receptores de membrana y moléculas implicadas en la transmisión de señales intracelulares. La distribución polarizada de estas moléculas es diferente entre los diversos tipos celulares. En general en el frente de avance se concentra la maquinaria molecular necesaria para la polimerización de actina y la detección de señales quimiotácticas (Mañes et al., 1999; Nieto et al., 1999; Ridley et al., 2003). En el urópodo se localizan, entre otras, proteínas del citoesqueleto, receptores de adhesión y algunos orgánulos (Campello et al., 2006; Sanchez-Madrid and Serrador, 2009).

Rac y Cdc42 promueven la protrusión y orientación del frente de avance (Ridley et al., 2003; Willard and Devreotes, 2006) regulando la actividad del complejo Arp2/3 que constituye la maquinaria de ramificación y nucleación de actina (Stradal et al., 2004). Por otra parte RhoA está involucrada en la formación del urópodo (Lee et al., 2004; Xu et al., 2003). RhoA activa a

la quinasa ROCK que a su vez fosforila las cadenas ligeras de miosina II y promueve la contracción de los filamentos de actina-miosina (Alblas et al., 2001; Worthylake et al., 2001) y la retracción del urópodo. El desplazamiento de la célula durante la migración depende, en gran medida, de la precisión en la coordinación de los procesos de protrusión en el frente de avance y contracción en el urópodo. Los fosfoinosítidos como el PIP2 y el PIP3 son reguladores claves de estos procesos (Fievet et al., 2004; Ling et al., 2006; Mañes et al., 2005; Ridley et al., 2003).

PIP5KI $\beta$  se localiza en el urópodo de leucocitos y está implicada en la regulación de la polarización y migración en respuesta a quimioatrayentes. La localización en el urópodo no depende de su actividad quinasa sino de su secuencia C-terminal (Lacalle et al., 2007). Los últimos 4 aminoácidos del C-terminal de PIP5KI $\beta$  constituyen un motivo de interacción con los dominios PDZ de la proteína adaptadora EBP50 (Mañes et al., 2010). Esta interacción con EBP50 permite a su vez la interacción con proteínas de la familia ERM (Lacalle et al., 2007), las cuales son activadas por el PIP2 (Fievet et al., 2004). La formación de este complejo permite la interacción de las ERM con el regulador negativo RhoGDI (“RhoGDP Dissociation Inhibitor”), lo que conduce a la activación de RhoA con la consiguiente activación de ROCK, la contracción de los filamentos de actina-miosina y la retracción del urópodo. La sobreexpresión de un mutante que carece de los últimos 83 aa del C-terminal (PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 456) (Lacalle et al., 2007), o de mutantes de PIP5KI $\beta$  que pierden el motivo de interacción con los dominios PDZ de EBP50 (Mañes et al., 2010) impide la polarización y la migración de células HL60 diferenciadas a neutrófilos (dHL60) inducida por el quimioatrayente *f*MLP. El efecto del mutante PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 456 es independiente de su actividad quinasa. La co-expresión de PIP5KI $\beta$  en células que expresan PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 456 permite recuperar la polarización y migración de las dHL60 frente a *f*MLP sugiriendo que, a través de una región distinta del C-terminal, PIP5KI $\beta$  podría interactuar con proteínas reguladoras de la polarización de leucocitos (Lacalle et al., 2007).

La región C-terminal (últimos 26 residuos) de PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub> también induce su localización en el urópodo de leucocitos de forma independiente de su actividad quinasa (Lokuta et al., 2007; Mathis et al., 2013). La ausencia de PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub> no inhibe la polarización como en el caso de PIP5KI $\beta$ , sin embargo el urópodo de estas células es más alargado y presenta problemas en su retracción (Lokuta et al., 2007), lo que sugiere una regulación defectuosa de la adhesión del urópodo en estas células. La región C-terminal de PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub> no es capaz de interactuar con EBP50; en cambio interacciona con Talina, promoviendo su translocación hacia el urópodo de células dHL60 estimuladas con *f*MLP (Mañes et al., 2010). Por tanto PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub> y PIP5KI $\beta$  se unen a diferentes proteínas y parecen regular la formación de diferentes complejos de señalización en el urópodo.

### 1.3.3. Los dominios PDZ de EBP50.

Las proteínas de la familia “Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor” NHERF (Minkoff et al., 1999; Weinman et al., 2000) desempeñan un papel central en el ensamblaje de complejos macromoleculares de señalización, así como la localización en la membrana y el reciclaje de receptores, canales iónicos y proteínas de adhesión en múltiples tejidos, mediante la interacción de sus dominios PDZ con la región citoplasmática de estas proteínas (Donowitz et al., 2005; Lamprecht and Seidler, 2006; Shenolikar et al., 2004; Thelin et al., 2005). NHERF1 se identificó inicialmente en tejido renal de conejo como un cofactor en la inhibición del intercambiador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, en el borde en cepillo del túbulo proximal de las nefronas, (Weinman et al., 1993; Weinman et al., 1995). El ortólogo humano de NHERF1 se identificó posteriormente con el nombre de “Ezrin-Radixin-Moesin-Binding-Phosphoprotein-50” (EBP50), una proteína que se une a la región C-terminal de las proteínas transmembranas mediante sus dominios PDZ y al citoesqueleto de actina en la región cortical a través de su dominio C-terminal (Reczek et al., 1997).

EBP50 es una proteína de 358 aa y consta de dos dominios globulares PDZ1 (aa 11-97) y PDZ2 (aa 150-240), que interaccionan con las regiones citoplasmáticas de receptores transmembrana y canales iónicos (Ardura and Friedman, 2011; Cheng et al., 2009; Cushing et al., 2008; Mahon et al., 2002), y un dominio C-terminal (aa 329-356) que interacciona con el dominio FERM de las proteínas ERM (Finnerty et al., 2004; Terawaki et al., 2006).

Los dominios PDZ1 y PDZ2 de EBP50 presentan una elevada similitud a nivel de secuencia, sin embargo existen diferencias en cuanto a los ligandos y la afinidad con que lo hacen (Cheng et al., 2009; Cushing et al., 2008; Li et al., 2007; Mahon and Segre, 2004). La mayoría de los ligandos de EBP50 interaccionan con el PDZ1 (Ardura and Friedman, 2011). Algunos de ellos interaccionan también con el PDZ2 aunque en general este dominio se une a un número más reducido de ligandos (Short et al., 1998; Voltz et al., 2001). Algunos receptores, como el Regulador de la Conductancia Transmembrana en la Fibrosis Quística (CFTR), la Acuaporina 9 (AQP9) y el Receptor de la Hormona Paratiroidea (PTHr), interaccionan con ambos dominios PDZ de EBP50, pero tienen una mayor afinidad por el PDZ1 (Mahon et al., 2002; Pietrement et al., 2008; Wheeler et al., 2008) (Ardura and Friedman, 2011; Hall et al., 1998a; Short et al., 1998). Sin embargo, el receptor de quimioquinas CXCR2 y la fosfolipasa-C-β2 (PLC-β2) interaccionan preferentemente con el PDZ2, respectivamente (Sun and Mierke, 2005; Wu et al., 2012). Estos resultados sugieren que los pequeños cambios en la secuencia de ambos dominios PDZ son suficientes para determinar la afinidad y especificidad de la interacción.

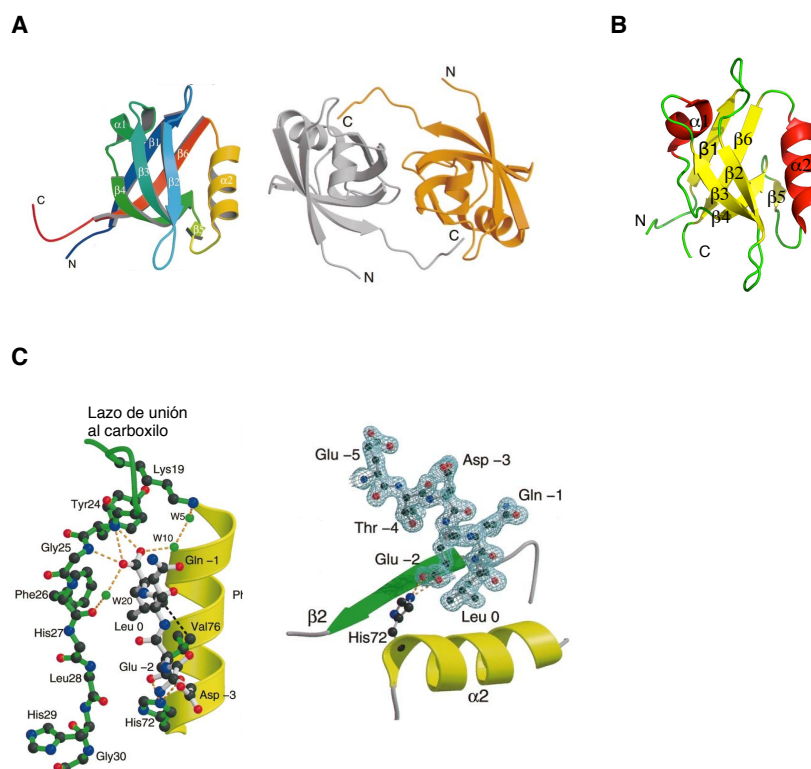
EBP50 puede adoptar una conformación cerrada en la cual los últimos 4 aa de su C-terminal (FSNL), que constituyen un motivo de unión a dominios PDZ, interaccionan con el PDZ2 de la propia proteína (Bhattacharya et al., 2010; Cheng et al., 2009). Esta conformación



puede cambiar mediante la liberación del C-terminal, como consecuencia de su interacción con el dominio FERM de proteínas ERM (Bhattacharya et al., 2010; Cheng et al., 2009; Finnerty et al., 2004; Terawaki et al., 2006) ó mediante la fosforilación de la S162 del PDZ2 por la proteína quinasa C (PKC) (Li et al., 2007).

#### *1.3.3.1 Estructura cristalográfica del dominio PDZ1 de EBP50.*

Uno de los objetivos de esta tesis es caracterizar estructuralmente la interacción del dominio C-terminal de PIP5KI $\beta$  con el PDZ1 de EBP50. La estructura de EBP50 no ha sido resuelta sin embargo se ha determinado la estructura cristalográfica del dominio PDZ1 (Karthikeyan et al., 2001a), del PDZ2 (PDB: 2JXO), el dominio C-terminal en complejo con el dominio FERM de Ezrina (Finnerty et al., 2004; Terawaki et al., 2006), así como de ambos dominios PDZ en interacción con algunos de sus ligandos (Holcomb et al., 2014; Karthikeyan et al., 2001b, 2002; Lu et al., 2013). La estructura de los PDZ de EBP50 es muy similar a la descrita para la mayoría de estos dominios y consta de un sándwich de dos láminas  $\beta$  flanqueado por dos hélices  $\alpha$  (Fig. 4A y B). Debido a que los últimos 4 aa del C-terminal del PDZ1 constituyen una secuencia de unión a dominios PDZ, en la estructura del PDZ1 se forma un dímero entre el C-terminal de una molécula y el bolsillo de unión a péptidos de otra molécula vecina (Fig. 4A). En el caso del PDZ2 (Fig. 4B) no se forman dímeros de este tipo, pues los aminoácidos C-terminales de este dominio (DEFFK) no constituyen un motivo de unión a PDZ.

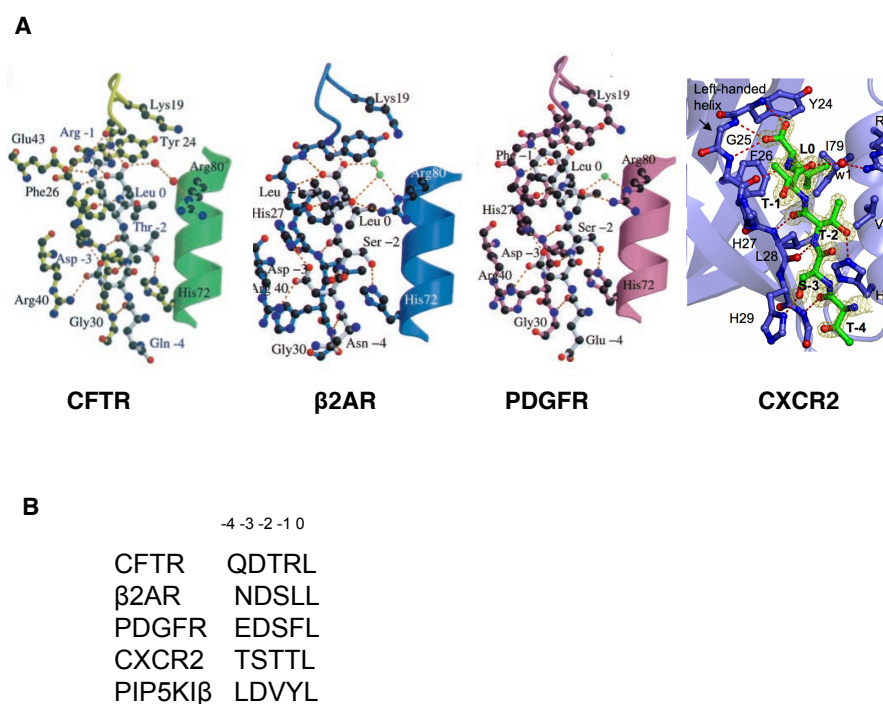


**Figura 4. La estructura de los PDZ de EBP50 es muy similar a la descrita para otros dominios PDZ.** Representaciones tipo “cartoon” de (A) el monómero y los homodímeros del dominio PDZ1 de EBP50 y (B) el PDZ2 de EBP50. (C) El C-terminal del PDZ1 se inserta en el bolsillo de unión a péptidos de manera perpendicular a la hebra  $\beta 2$  mediante las interacciones de la L0 con los residuos del bolsillo hidrofóbico y el E(-2) con la H72. El péptido se muestra en diagrama de barras con los carbonos en negro, los nitrógenos en azul y los oxígenos en rojo. Se muestra además el mapa de densidades electrónicas (derecha) y la interacción ampliada entre el E(-2) y la H72. (A y C adaptados de (Karthikeyan et al., 2001a).

La estructura del PDZ1 reveló además que el péptido C-terminal (DEQL) se inserta en el bolsillo de unión de manera perpendicular a la hebra  $\beta 2$  y no se produce el fenómeno de “ $\beta$ -sheet augmentation” (Fig. 4A y C). Esto es posible ya que el grupo carboxilato del E(-2) forma un puente de hidrógeno con uno de los nitrógenos en la cadena lateral de la H72 (Karthikeyan et al., 2001a) (Fig. 4C) y la larga cadena lateral del E(-2) aleja el resto del péptido (DEQL) del bolsillo de unión, impidiendo la interacción del resto de los residuos con la hebra  $\beta 2$ .

El arreglo dimérico intermolecular que tiene lugar entre los dominios PDZ1 de EBP50 constituyen una herramienta muy útil en el estudio estructural de las interacciones entre los PDZ y los ligandos naturales de EBP50. La sustitución del C-terminal del PDZ por el correspondiente C-terminal del ligando da lugar a una molécula quimera, permitiendo caracterizar estructuralmente el complejo PDZ-ligando a partir de la resolución de su estructura. Esta estrategia ha sido empleada con éxito para el análisis estructural de las interacciones del PDZ1 de EBP50 con el C-terminal del CFTR

(Karthikeyan et al., 2001b), el Receptor  $\beta$ 2-Adrenérgico ( $\beta$ 2AR) (Karthikeyan et al., 2002), el Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGFR) (Karthikeyan et al., 2002) y el Receptor de Quimioquinas CXCR2 (Lu et al., 2013). La resolución de estas estructuras ha permitido conocer los determinantes de la especificidad y la afinidad de estas interacciones. En todos los casos los péptidos se insertan mediante “ $\beta$ -sheet augmentation” y establecen numerosos contactos con los residuos de la hebra  $\beta$ 2, la hélice  $\alpha$ 2, así como los lazos  $\beta$ 1- $\beta$ 2 y  $\beta$ 2- $\beta$ 3 (Karthikeyan et al., 2001b, 2002; Lu et al., 2013) (Fig. 5A). Habitualmente se considera que los enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilo y amida de las cadenas principales del péptido y del PDZ contribuyen a la afinidad de la interacción, mientras que los enlaces entre los residuos de las cadenas laterales intervienen en la especificidad por un ligando (Ivarsson, 2012; Luck et al., 2012; Tonikian et al., 2008). Sin embargo, se ha visto que todos los residuos del péptido contribuyen en mayor o menor medida a la afinidad de la interacción con los dominios PDZ (Tonikian et al., 2008).



**Figura 5. Estructuras del dominio PDZ1 de EBP50 unido a algunos de sus ligandos.** (A) Visión tridimensional del bolsillo de unión a péptidos del PDZ1 de EBP50 en interacción con el C-terminal de CFTR,  $\beta$ 2AR, PDGFR y CXCR2. Los átomos de C, O, y N se muestran en negro, rojo y azul, respectivamente; las moléculas de agua como esferas verdes y los enlaces de hidrógeno como líneas discontinuas rojas. Los residuos en las posiciones 0, -2 y -4 determinan la afinidad, mientras que los contactos de los residuos -1 y -3 son determinantes de la especificidad por el ligando. Adaptado de (Karthikeyan et al.,

2001b, 2002; Lu et al., 2013). **(B)** Comparación de las secuencias de los últimos 5 aminoácidos de CFTR,  $\beta$ 2AR, PDGFR, CXCR2 y PIP5KI $\beta$ .

Al analizar las secuencias del C-terminal de los ligandos del PDZ1 de EBP50 cuya estructura ha sido resuelta vemos que existen posiciones conservadas o semiconservadas, tal es el caso de la L0 y la S/T(-2). Esto sugiere una interacción similar de L0 y S/T(-2) con el PDZ1 en todos los ligandos. Las posiciones -1 y -3 son más variables (Fig. 5B). En todos los casos, la L0 se acomoda en el bolsillo hidrofóbico de manera similar a como lo hace en la estructura de los homodímeros de PDZ1 (Fig. 4C), estableciendo los mismos contactos polares e hidrofóbicos con los residuos del bolsillo del PDZ1 (Fig. 5A). La sustitución de L0 por residuos apolares con cadenas laterales más pequeñas (V ó A) disminuye la afinidad de la interacción de los ligandos con ambos PDZ de EBP50, mientras que otro tipo de residuo puede eliminar por completo la interacción (Hall et al., 1998b; Mamonova et al., 2012; Moyer et al., 2000). La diferencia en la longitud de la cadena lateral del residuo -2 (S o T; Fig. 5B) no afecta a los enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxilo y amida de la S/T y los grupos amida y carboxilo de L28 de la hebra  $\beta$ 2 del PDZ1 (Fig. 5A). El hidroxilo de la cadena lateral de S/T(-2) interacciona mediante un puente de hidrógeno con el anillo imidazólico de la H72 de la hélice  $\alpha$ 2. Se establecen además contactos hidrofóbicos entre las cadenas laterales de S/T(-2) con la V76 (Karthikeyan et al., 2001b, 2002; Lu et al., 2013).

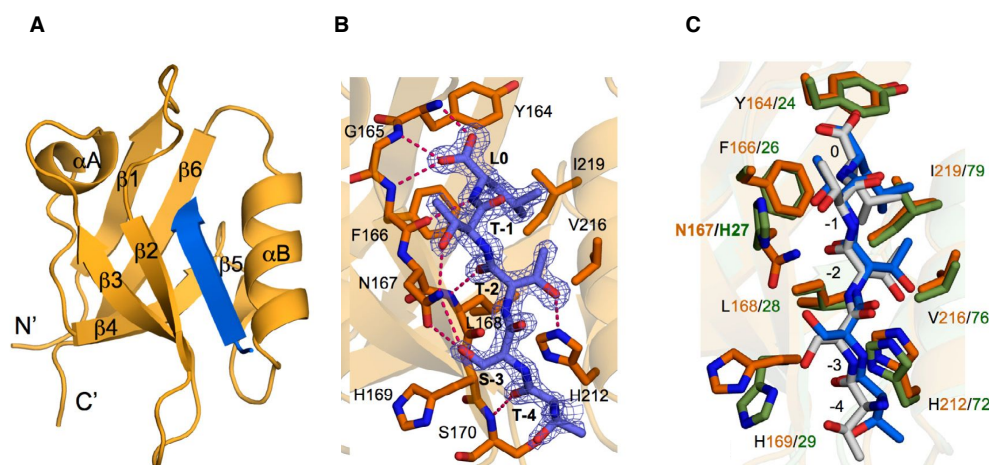
Las interacciones de las posiciones -1 y -3 con los residuos del PDZ1 difieren de un ligando a otro. La R(-1) del CFTR forma dos puentes salinos con un oxígeno de la cadena lateral del E43 y dos puentes de hidrógeno con el carbonilo de la N22 (Karthikeyan et al., 2001b) (Fig. 5A). Esto demuestra la importancia de las interacciones del residuo en posición -1 en la especificidad del PDZ por este ligando y concuerda con otros estudios que demuestran que la R(-1) es el residuo preferido en esta posición para la interacción con los PDZ de EBP50 (Hall et al., 1999; Mamonova et al., 2012; Wang et al., 1998). Los grupos carbonilos de L(-1) en  $\beta$ 2AR y F(-1) en PDGFR establecen un enlace de hidrógeno con la R(80) de la hélice  $\alpha$ 2 del PDZ1 de EBP50, mientras que sus cadenas laterales establecen varios contactos hidrofóbicos con la cadena lateral de la H27 en la hebra  $\beta$ 2 del PDZ1 (Karthikeyan et al., 2002) (Fig. 5A). Por su parte el grupo hidroxilo de la cadena lateral de T(-1) de CXCR2 interacciona mediante un puente de hidrógeno con la H27 del PDZ1, mientras que el carbonilo de T(-1) establece un enlace de hidrógeno con la R(80) mediado por una molécula de agua (Lu et al., 2013) (Fig. 5A). El D(-3) de los ligandos CFTR, PDGFR y  $\beta$ 2AR interacciona, de manera similar en los tres casos: los oxígenos de la cadena lateral del D(-3) forman un puente salino con la R40 y un enlace de hidrógeno con la H27 del PDZ1 mientras que la S(-3) de CXCR2 forma un

enlace de hidrógeno con la H29 del PDZ1. Todo lo anterior sugiere la importancia de los residuos en posición -1 y -3 en el reconocimiento específico de un ligando a través de las interacciones que establecen sus cadenas laterales con residuos del PDZ.

En todos los ligandos del PDZ1 de EBP50 con estructura resuelta (CFTR, PDGFR,  $\beta$ 2AR y CXCR2), el carbonilo de los residuos en posición -4 forma un puente de hidrógeno con el nitrógeno amida de la G30 contribuyendo ligeramente a la afinidad de estas interacciones. La N(-4) de  $\beta$ 2AR forma dos puentes de hidrógenos adicionales con el carboxilo y el amino de la G30 del PDZ1 contribuyendo en gran medida a la afinidad de esta interacción (Karthikeyan et al., 2002) (Fig. 5A). Los residuos en posición -4 de los restantes ligandos, orientan sus cadenas carbonadas hacia el solvente y no establecen ningún otro contacto con el PDZ1, con lo cual no contribuyen adicionalmente a la afinidad ni la especificidad de la interacción (Fig. 5A).

#### *1.3.3.2. Estructura cristalográfica del complejo PDZ2 de EBP50 con el C-terminal de CXCR2.*

Recientemente se ha resuelto la estructura cristalográfica del PDZ2 de EBP50 unido al C-terminal de CXCR2 (PDZ2-CXCR2), mediante una aproximación similar a la empleada para el PDZ1 (Holcomb et al., 2014). El plegamiento del PDZ2 es muy similar al del PDZ1 (Fig. 6A). El péptido del CXCR2 se incorpora como una hebra adicional a la hebra  $\beta$ 2 del PDZ2, igual a como sucede en los ligandos del PDZ1 (Karthikeyan et al., 2001b, 2002; Lu et al., 2013). La L0 se incorpora en un bolsillo hidrofóbico constituido por los residuos Y164, G165, F166, y L168 de la hebra  $\beta$ 2 y V216 e I219 de la hélice  $\alpha$ 2 (Fig. 6B) (Lu et al., 2013). Esto refleja la importancia de L en posición 0 así como su contribución a la afinidad y especificidad de la interacción con el ligando en ambos dominios PDZ de EBP50. Las interacciones de los residuos en las posiciones T(-1) y T(-2) son muy similares a las que se establecen con el PDZ1 en estas posiciones (Holcomb et al., 2014; Lu et al., 2013) (Fig. 5A y 6B).



**Figura 6. La estructura de PDZ2-CXCR2 muestra pequeñas diferencias en relación a PDZ1-CXCR2.**

(A) Representación tipo “cartoon” de la estructura del PDZ2-CXCR2, el péptido se muestra en azul. (B) Principales interacciones PDZ-ligando en la estructura PDZ2-CXCR2. El péptido y los residuos con los que interacciona se muestran en diagrama de barras con los carbonos en violeta (péptido) y en naranja (PDZ2), en ambos casos los oxígenos están en rojo y los nitrógenos en azul, las líneas discontinuas rojas simbolizan los enlaces de hidrógeno. El resto del PDZ2 se representa en “cartoon” en color ocre. (C) Alineamiento de las estructuras PDZ1-CXCR2 y PDZ2-CXCR2. Los residuos del PDZ y el péptido se muestran en diagrama de barras con los carbonos en verde (PDZ1) y gris (CXCR2) y en naranja (PDZ2) y azul (CXCR2) (residuo PDZ2/PDZ1); los oxígenos y nitrógenos como en A. (Tomado de (Holcomb et al., 2014).

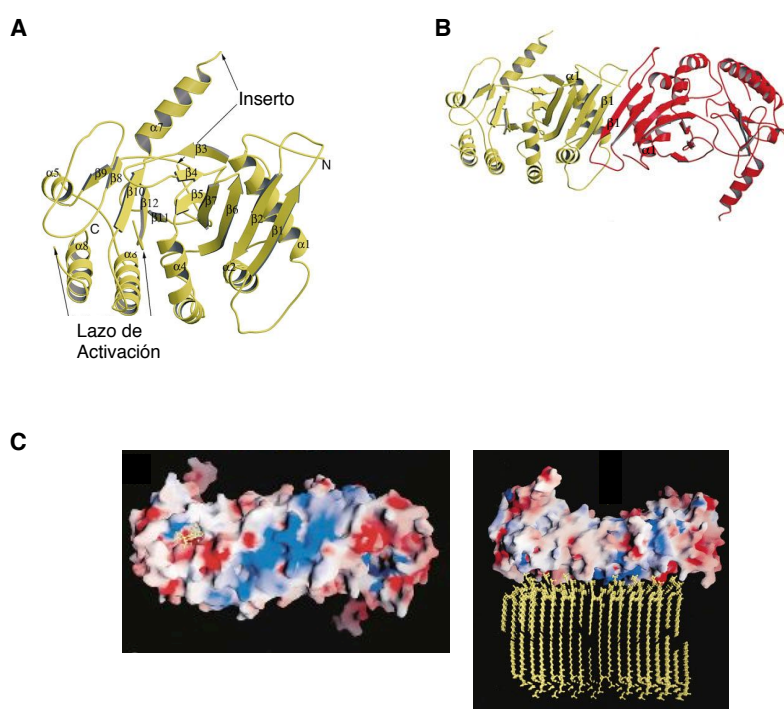
Al superponer las estructuras PDZ1-CXCR2 y PDZ2-CXCR2 (Holcomb et al., 2014) la mayor diferencia se encuentra en la conformación del residuo en posición -3 así como los residuos N167(PDZ2)/H27(PDZ1) y H169(PDZ1)/H29(PDZ2) (Fig. 6C). El grupo hidroxilo de la S(-3) forma un doble puente de hidrógeno con el oxígeno carbonílico y el nitrógeno amida de la cadena lateral de N167 (Fig. 6B). En la interacción PDZ1-CXCR2, la orientación del grupo imidazólico de la H27 no permite la formación de un enlace de hidrógeno con el OH de la S(-3); la H29 en cambio adopta una conformación en la cual se favorece la interacción con el OH de S(-3) y ambos residuos interaccionan mediante un puente de hidrógeno (Fig. 6A). Por tanto el doble puente de hidrógeno de S(-3) con N167 constituyen interacciones específicas del PDZ2 de EBP50 en su interacción con C-terminal de CXCR2. El carbonilo de la T-4 de CXCR2 forma un puente de hidrógeno con el grupo amino de la G170 (G30 en el PDZ1) y no involucra su cadena lateral en interacción alguna con el PDZ2, tal como sucede en su interacción con el PDZ1 (Figs. 5A y 6B). Los residuos L0 y T(-2) contribuyen fundamentalmente a la afinidad del ligando por el PDZ a partir de las fuertes interacciones que establecen a través de sus cadenas principales, mientras que los residuos en las posiciones -1 y -3 del C-terminal de CXCR2 contribuyen a la especificidad mediante las interacciones de sus cadenas laterales con los residuos del PDZ. Uno de nuestros objetivos es definir la

interacción del dominio de PIP5KI $\beta$  unido al PDZ2 de EBP50 y compararlo con la estructura del complejo PIP5KI $\beta$ -PDZ1.

#### **1.4. Evidencias sobre la dimerización de las PIP5KI.**

Hasta el momento, no se ha podido determinar la estructura de ninguna de las isoformas de PIP5KI. Las PIP5KI tienen una homología de secuencia con las PIP4KII de aproximadamente 35%-40% (Loijens and Anderson, 1996). Las principales semejanzas se concentran en el dominio central de actividad quinasa. Se han identificado 3 isoformas de PIP4KII ( $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ) (Boronenkov and Anderson, 1995; Castellino et al., 1997; Divecha et al., 1995; Itoh et al., 1998) y su estructura ha sido resuelta.

La estructura de PIP4KII $\beta$  fue la primera que se determinó (Rao et al., 1998) y consiste en dos monómeros relativamente globulares que se asocian para formar un dímero en solución. Cada monómero consta de dos grandes dominios N- y C-terminales constituidos por sendas láminas  $\beta$  flanqueadas por varias  $\alpha$ -hélices (Fig. 7A). La tercera de las  $\alpha$ -hélices del dominio C-terminal ( $\alpha 7$ ) contiene los primeros 15 de un total de 70 aa en una secuencia poco conservada (tanto en las PIP4KII como en las PIP5KI) conocida como “inserto” (Boronenkov and Anderson, 1995). En la estructura de PIP4KII $\beta$ , los residuos 304-342 que comprenden la región central del inserto y el lazo de activación (LA, aa 373-390) se encuentran desordenados (Fig. 7A). La interfase entre los dos monómeros está constituida por una región en forma de cierre que abarca las dos láminas  $\beta$  de cada dominio N-terminal, dispuestas una a continuación de la otra, mediante la interacción antiparalela de sus hebras  $\beta 1$  y las hélices  $\alpha 1$  (Fig. 7B) (Burden et al., 1999; Rao et al., 1998). Se desconoce si la dimerización responde a un equilibrio dinámico entre los monómeros y el dímero o está regulada por mecanismos moleculares que implican otras proteínas, sin embargo la dimerización podría favorecer la asociación con la membrana de las PIP4KII $\beta$  (Burden et al., 1999).



**Figura 7. La estructura de la PIP4KIIβ revela la formación de dímeros en estas quinasas.**

Representación tipo “cartoon” de (A) monómero de PIP4KIIβ (se numeran los elementos de estructura secundaria y se señalan el LA y el inserto) y (B) dímero de PIP4KIIβ (los monómeros se muestran en ocre y rojo, se numeran las hélices α1 y hebras β1 implicadas en la formación de la interfase de dimerización). (C) Representación de superficie del dímero de PIP4KIIβ con

la región de interacción con la membrana orientada hacia el lector y las moléculas de PI4P y ATP en el sitio catalítico (izquierda) y en interacción con una membrana de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) (derecha). En ambos casos las superficies se han coloreado de acuerdo al rango del potencial electrostático, (Adaptado de (Rao et al., 1998).

Aunque los monómeros de PIP4KIIβ son globulares, el dímero tiene forma de disco alargado y aplanado con unas dimensiones aproximadas de 100 Å de largo x 40 Å de ancho x 30 Å de grosor. La región central de una de las caras del disco es muy básica y aplanada (Fig. 7C) y posee un parche de residuos básicos a lo largo de la interfase de interacción de los dos monómeros, lo cual sugiere que esta región podría estar implicada en la interacción con las cabezas polares negativas de los fosfolípidos en la membrana plasmática (Fig. 7C). La mutación K/D en tres residuos de esta región, reduce la carga positiva, sin afectar la dimerización, e impide la asociación con la membrana (Adams et al., 2010; Burden et al., 1999). Esto demuestra que la naturaleza básica de esta región del dímero es fundamental para la interacción con la superficie negativa de la membrana plasmática. Se ha modelado la interacción de PIP4KIIβ con una bicapa de DMPC (Fig. 7C derecha) (Rao et al., 1998). De acuerdo con el modelo, el contacto de PIP4KIIβ con las membranas ocurre casi exclusivamente por medio de las interacciones electrostáticas con las cabezas polares de los fosfolípidos sin que la quinasa penetre en la membrana (Hurley and Grobler, 1997; Jerga et al., 2009; Shao et al., 2007).

Las estructuras cristalográficas de las PIP4KIIα (PDB: 2YBX) y PIP4KIIγ (PDB: 2GK9) también han sido resueltas y son muy similares a la de PIP4KIIβ. Estas isoformas también dimerizan en forma de disco aplanado, a partir de monómeros globulares y lo hacen a



través de una interfase en forma de cierre, que involucra las hélices  $\alpha 1$  y las hebras  $\beta 1$  de cada monómero en la región N-terminal. El resto de la estructura es similar a la de PIP4KII $\beta$ . En el caso de PIP4KII $\gamma$  los dímeros interaccionan formando un tetrámero a través de una región que implica las hélices  $\alpha 2$  y los lazos  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  y  $\beta 1$ - $\beta 2$  de cada monómero. La estructura de PIP4KII $\gamma$  nos hace plantearnos la posibilidad de formación de oligómeros funcionales en estas proteínas, aún cuando se desconoce si esta forma cristalizada es activa o no y si el tetrámero se podría formar en las células. Por lo tanto, de acuerdo con las estructuras cristalográficas, las PIP4KII pueden formar dímeros. La homo y heterodimerización de las isoformas de PIP4KII también se ha observado a nivel celular (Bultsma et al., 2010; Clarke and Irvine, 2013; Hinchliffe et al., 2002; Wang et al., 2010).

Teniendo en cuenta la homología de secuencia entre las PIP5KI y las PIP4KII, se ha modelado la estructura de las tres isoformas de las PIP5KI (Fairn et al., 2009) empleando como molde la estructura de la PIP4KII $\beta$  (Rao et al., 1998). Los modelos obtenidos sugieren que las tres isoformas de PIP5KI son estructuralmente muy similares a PIP4KII $\beta$  y, teóricamente, podrían formar dímeros a través de una región homóloga a las hélices  $\alpha 1$  y las hebras  $\beta 1$  de cada monómero en PIP4KII $\beta$ . Sin embargo, hasta donde conocemos no se han obtenido evidencias que confirmen la homo- o heterodimerización de PIP5KI, lo cual constituye uno de los objetivos originales de esta tesis.



# Objetivos



## 2. Objetivos

- 1- Resolver la estructura cristalina de PIP5KI $\beta$ , así como del complejo formado por los dominios PDZ de EBP50 y el C-terminal de PIP5KI $\beta$ .
- 2- Identificar nuevas proteínas que interaccionan con PIP5KI $\beta$ .
- 3- Determinar la capacidad de PIP5KI $\beta$  para formar homodímeros y heterodímeros con otras isoformas de PIP5KI.
- 4- Estudiar las implicaciones funcionales de la dimerización de PIP5KI $\beta$ .



# **Materiales y Métodos**







# Resultados



## 4. Resultados

### 4.1. Estudio cristalográfico de la interacción del extremo carboxilo de PIP5KI $\beta$ con los dominios PDZ de la proteína EBP50.

PIP5KI $\beta$  se localiza en el urópodo celular y es esencial para la polarización y la quimiotaxis de leucocitos. La interacción de PIP5KI $\beta$ , a través de su región C-terminal, con los dominios PDZ1 y PDZ2 de la proteína EBP50 permite la formación de un complejo con proteínas ERM que regulan la retracción del urópodo durante la quimiotaxis (Lacalle et al., 2007; Mañes et al., 2010).

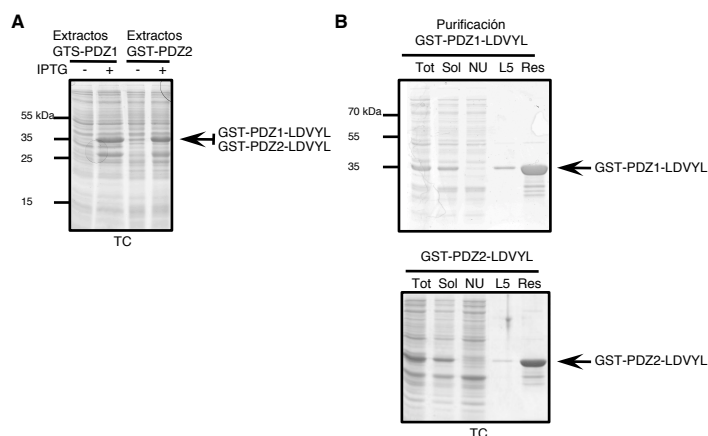
Con el objetivo de caracterizar estructuralmente la interacción PIP5KI $\beta$ -EBP50 decidimos resolver la estructura cristalina de los dominios PDZ1 y PDZ2 de EBP50 en interacción con la región C-terminal de PIP5KI $\beta$ . La sustitución del C-terminal del PDZ por el correspondiente C-terminal del ligando es una herramienta muy útil para caracterizar estructuralmente el complejo PDZ-ligando (ver Introducción), ya que se pueden formar dímeros entre el C-terminal de una molécula de PDZ1 y el bolsillo de unión a péptidos de otra molécula de PDZ1 vecina (Karthikeyan et al., 2001a). Aprovechamos esta característica para sustituir los últimos 5 aminoácidos del PDZ1 (TDEQL) y del PDZ2 (EFFKK) por los correspondientes, LDVYL, del extremo C-terminal de PIP5KI $\beta$  y resolver la estructura de las proteínas PDZ1-LDVYL y PDZ2-LDVYL.

#### 4.1.1. Purificación de las proteínas de fusión PDZ1-LDVYL y PDZ2-LDVYL.

Disponíamos de los plásmidos pGEX-4T1-GST-PDZ1 y pGEX-4T1-GST-PDZ2, generados previamente en nuestro laboratorio (Mañes et al., 2010) y a partir de ellos obtuvimos, mediante clonaje de los dominios PDZ1 y PDZ2, en el vector pGEX-5X1, los plásmidos GST-PDZ1 y GST-PDZ2. Mediante mutagénesis dirigida de estos dos vectores obtuvimos los plásmidos GST-PDZ1-LDVYL y GST-PDZ2-LDVYL. *E.coli* BL21(DE3)TrxB transformada con estos plásmidos expresa el gen de interés bajo el control del promotor de la RNA-polimerasa T7 del fago lambda de manera inducible por IPTG. Ambas proteínas se procesaron de igual manera y tuvieron un comportamiento similar en cuanto a su expresión y posterior proceso de purificación.

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción de Coomassie (TC) comprobamos la expresión de las proteínas en los lisados de los cultivos bacterianos inducidos con IPTG (Fig. 8A). Se utilizaron lisados bacterianos no inducidos como control. Se observó la presencia de una proteína con un peso molecular de 35 kDa, similar al esperado para GST-PDZ1-LDVYL y GST-PDZ2-LDVYL, sólo en muestras inducidas. También se indujo, aunque en menor cantidad, una proteína con peso molecular correspondiente a GST. En ambos casos

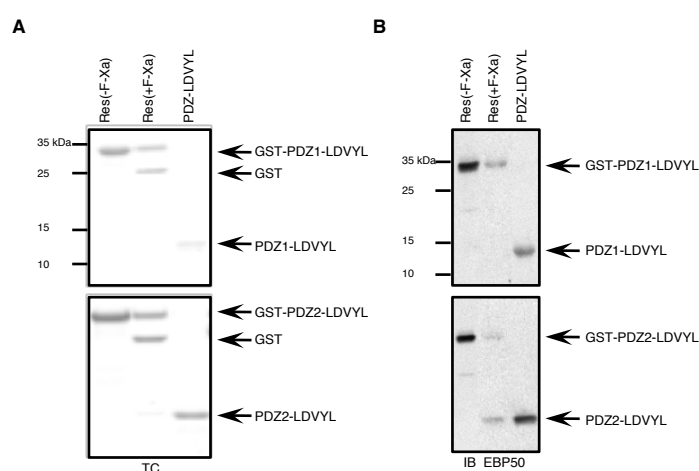
alrededor del 60% de cada una de las proteínas se detectó en la fracción soluble. Una vez verificada la expresión y solubilidad de GST-PDZ1-LDVYL y GST-PDZ2-LDVYL, se procedió a su purificación mediante cromatografía de afinidad empleando la resina “Glutathione-Sepharose” (Fig. 8B).



**Figura 8. Expresión de las proteínas GST-PDZ1-LDVYL y GST-PDZ2-LDVYL en *E. coli*.** (A) Inducción de la expresión de las proteínas GST-PDZ1-LDVYL y GST-PDZ2-LDVYL con IPTG, analizada mediante TC en extractos de *E. coli* transformada con GST-PDZ1-LDVYL y GST-PDZ2-LDVYL. (+) inducción con IPTG, (-) no inducción. (B) Purificación de GST-PDZ1-LDVYL y GST-PDZ2-

LDVYL con “Glutathione-Sepharose”. TC de las fracciones Total (Tot), Soluble (Sol), No Unido (NU), Lavado 5 (L5) y proteína unida a la resina (Res).

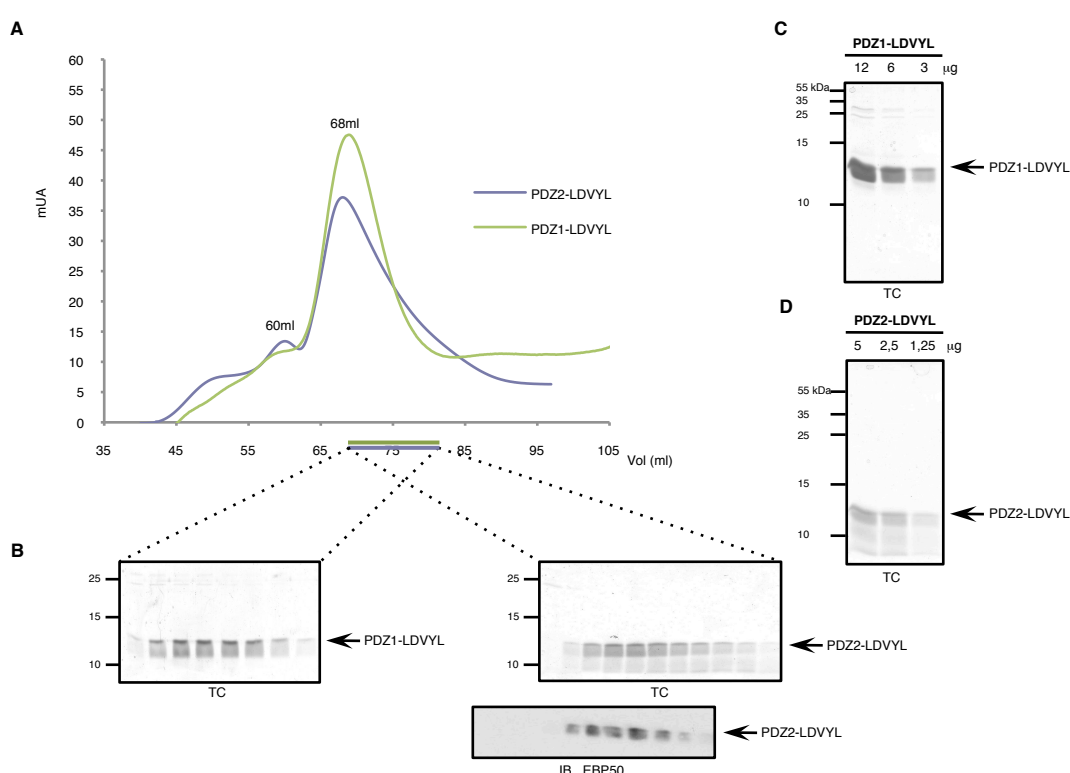
La purificación por afinidad permitió enriquecer las muestras en aproximadamente un 85% tanto en GST-PDZ1-LDVYL como en GST-PDZ2-LDVYL (Fig. 8B). Las proteínas unidas a la resina se digirieron con la proteasa Factor Xa (F-Xa) para eliminar la GST. Se observó mediante TC que la digestión rindió dos proteínas solubles (~10 kDa) (Fig. 9A), que se identificaron como PDZ1-LDVYL y PDZ2-LDVYL mediante inmunoblot (IB) con anticuerpos anti-EBP50 (Fig. 9B).



**Figura 9. Digestión de GST-PDZ1-LDVYL y GST-PDZ2-LDVYL con Factor Xa.** (A) TC de las proteínas GST-PDZ1-LDVYL y GST-PDZ2-LDVYL antes (Res-F-Xa), después (Res+F-Xa) y proteína soluble tras el tratamiento con F-Xa. (B) IB con anti-EBP50 de las muestras de (A). Las flechas indican la migración relativa de cada proteína.

Las proteínas solubles PDZ1-LDVYL y PDZ2-LDVYL se sometieron a cromatografía de exclusión molecular en una columna de Superdex S75, con el objetivo de purificarlas a homogeneidad. En los cromatogramas de elución se observó un pico con un volumen de

exclusión de 68 ml, que podría corresponder al dímero para cada una de las proteínas PDZ. También se observó un pico de menor tamaño, con volumen de exclusión de 60 ml, que correspondería a proteínas de 42 kDa (Fig. 10A). En ningún caso se observaron las formas monoméricas, que tendrían un volumen de exclusión de 75 ml. El análisis por SDS-PAGE reveló, en ambos casos, una banda de peso molecular de 12 kDa en las fracciones del pico de 68 ml, correspondiente a los dímeros de los PDZ quiméricos; dichas bandas no se observaron en las fracciones de mayor peso molecular (Fig. 10B). En el caso de PDZ2-LDVYL comprobamos mediante IB con anti-EBP50 que, en efecto, dicha banda correspondía a PDZ2-LDVYL (Fig. 10B).



**Figura 10. Purificación de las proteínas PDZ1-LDVYL y PDZ2-LDVYL por cromatografía de exclusión molecular y análisis de la pureza de las proteínas purificadas.** (A) Cromatogramas de PDZ1-LDVYL (verde) y PDZ2-LDVYL (violeta) eluidos de la columna Superdex S75. Se representa el volumen de exclusión (ml) respecto a la absorbancia en unidades arbitrarias (mAU). Se indica el volumen de exclusión del centro de cada pico. (B) Análisis por IB con anti-EBP50 de las fracciones correspondientes a los picos mostrados de PDZ2-LDVYL en (A). Comprobación de la pureza de las proteínas PDZ1-LDVYL (C) y PDZ2-LDVYL (D) por TC.

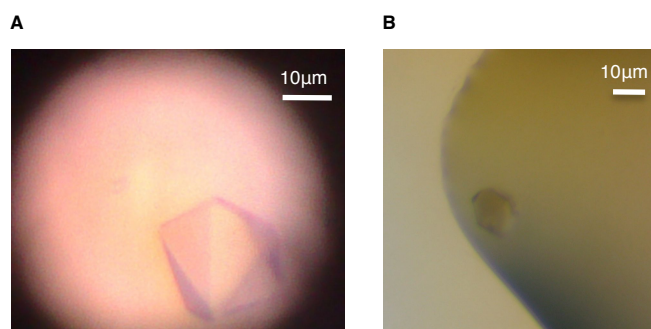
Se eligieron las fracciones comprendidas entre los volúmenes de elución 68 ml a 82 ml, que contenían mayor cantidad y pureza de proteínas (Fig. 10B) y se concentraron hasta 7 mg/ml (PDZ1-LDVYL) y 17 mg/ml (PDZ2-LDVYL) respectivamente. La pureza, estimada por TC, fue del 90%. (Fig. 10C y D).

Se consideró que las proteínas PDZ1-LDVYL y PDZ2-LDVYL tras un paso de purificación por afinidad y otro de filtración en gel estaban purificadas a homogeneidad. Partiendo de cultivos de *E.coli* que expresaban, en ambos casos, 20 mg de proteína, obtuvimos tras la purificación 0,7 mg de PDZ1-LDVYL y 1,7 mg de PDZ2-LDVYL, lo que representa un rendimiento del proceso de purificación del 3,5% para PDZ1-LDVYL y 8,5% para PDZ2-LDVYL.

#### 4.1.2. Cristalización de la proteína PDZ1-LDVYL.

A partir de la preparación de PDZ1-LDVYL purificada procedimos a su cristalización mediante el método de la gota sentada. El mismo se basa en el equilibrio de vapor que se establece entre una gota de la solución de proteína, que contiene agentes precipitantes y una solución más concentrada de los mismos precipitantes.

Se realizó una búsqueda de condiciones de cristalización, utilizando “kits” comerciales [JBScreen Basic HTS y JBScreen Classic HTS-I (PEG based)] y empleando 150 nanolitros (nl) de proteína concentrada por gota y condición. Se obtuvieron cristales en tan sólo dos condiciones de las 192 ensayadas: 100 mM HEPES pH 7,5, 2% PEG400, 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (condición 1) y 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (condición 2). Los cristales obtenidos de  $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m} \times 15\mu\text{m}$ , de dimensiones similares en ambos casos, presentaron forma de bipirámide de base exagonal (Fig. 11). Las dimensiones de estos cristales estaban en el límite de lo que se considera apropiado tanto para su manipulación como para obtener una buena difracción.



**Figura 11. Cristales de PDZ1-LDVYL.** Fotografía de los cristales de PDZ1-LDVYL obtenidos en 100 mM HEPES pH 7,5, 2% PEG400, 2M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (condición 1) (A), y en 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 2M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (condición 2) (B). Barra, 10  $\mu\text{m}$ .

Con objeto de obtener cristales de mayor tamaño variamos las condiciones de cristalización utilizando ligeras variaciones del pH y de la concentración de agentes precipitantes a partir de la condición 1. Ensayamos 15 nuevas condiciones y obtuvimos cristales en dos de ellas (100 mM HEPES pH 7,5, 1% PEG400, 1,8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 100 mM HEPES pH 7,5, 2% PEG400, 1,8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) pero en ningún caso logramos un incremento de sus dimensiones. Los cristales de las condiciones 1 y 2 se montaron en criolazos, se transfirieron a

soluciones de cristalización que contenían 30% etilenglicol y 20% glicerol, respectivamente, como crioprotectores y se congelaron en nitrógeno.

Las muestras fueron sometidas a difracción en la línea PROXIMA 1 del sincrotrón SOLEIL. Solo los cristales de la condición 1 difractaron a una resolución de 1,6 Å. Los datos de difracción fueron indexados e integrados con el programa XDS (Kabsch, 2010). Los cristales de PDZ1-LDVYL pertenecen al grupo espacial P3<sub>1</sub>21, contienen una molécula en la unidad asimétrica y un 56,3 % de solvente (Tabla 4).

**Tabla 4. Datos cristalográficos y del refinamiento de la estructura de PDZ1-LDVYL.**

COLECCIÓN DE DATOS	PDZ1-LDVYL
<b>Grupo espacial</b>	P3 <sub>1</sub> 21
<b>Dimensiones Celda</b>	
a, b, c (Å)	54.4, 58.4, 57.13
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90, 90, 120
Longitud de onda (Å)	1,005
Resolución (Å)	24.88 - 1.6
Rsimetría o Rconvergencia	0.047 (0.48)
I / $\sigma$ I	30.91 (2.98)
Compleitud (%)	99.66 (96.56)
Redundancia	4.8 (4.5)
<b>REFINAMIENTO</b>	
Resolución (Å)	24.877 – 1.6
No. Reflexiones	28796 (15274)
Factor-R/ Factor-R libre	0.1464 / 0.1679
Residuos favorables Ramachandran (%)	99
Residuos no favorables Ramachandran(%)	0
<b>Número de Átomos</b>	
Proteína (A/B)	716
Agua	147
<b>Factor-B</b>	
Proteína (A/B)	17.4
Agua	30.5
<b>Desviaciones R.M.S.</b>	
Longitud de enlace (Å)	0.009
Ángulo de enlace (°)	1.3

Entre paréntesis se muestran los valores para el rango más alto de resolución de los datos cristalográficos.

#### 4.1.3. Resolución de la estructura cristalina del dominio PDZ1 de EBP50 en interacción con el C-terminal de PIP5KI $\beta$ .

La determinación de la estructura se llevó a cabo mediante reemplazo molecular con el programa PHASER (McCoy et al., 2007) tomando como modelo la estructura del PDZ1 de EBP50 (PDB: 1G9O). La estructura se ajustó manualmente y se refinó con el programa Coot (Emsley et al., 2010) y la suite de programas CCP4 y PHENIX (Adams et al., 2010; Winn et al., 2011). La evaluación de la estereoquímica, con el programa PROCHECK (Winn et al., 2011), mostró el 95% de los residuos en la región más favorecida y un 5% en las regiones permitidas adicionales, sin

ningún residuo en la región no permitida del diagrama de Ramachandran. Las estadísticas del refinamiento se muestran en la Tabla 4.

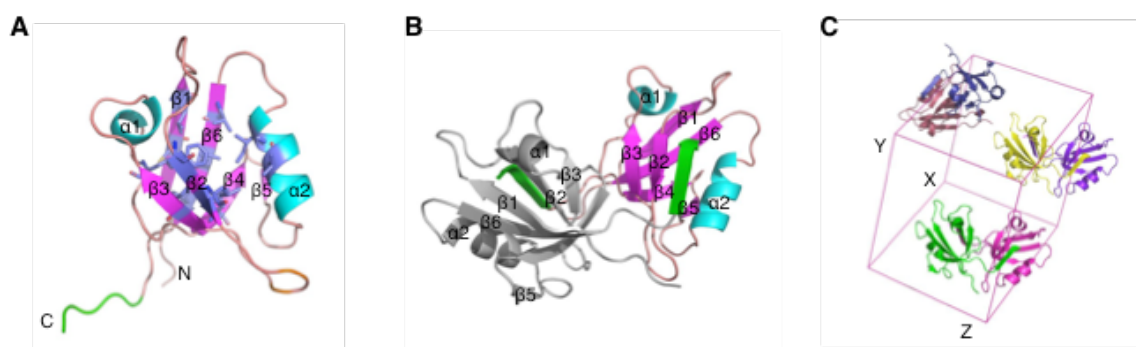
La estructura de la unidad monomérica de PDZ1-LDVYL consiste en un barril de 6 hebras beta ( $\beta$ 1- $\beta$ 6) flanqueado por dos alfa hélices ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 2) (Fig. 12A). Los residuos C15, L17,



Y24, G25, F26, L28, I39, L53, L59, V76, I79, V86, L88 y V90 conforman el interior hidrofóbico de la molécula (Fig. 12A). El exterior del barril es hidrofílico. La hélice  $\alpha 2$  se sitúa casi paralela a la hebra  $\beta 2$  dando lugar a una cavidad de  $\sim 20$  Å de longitud, 10 Å de ancho y 9 Å de profundidad (Fig. 12A) que se estrecha profundamente hacia la parte central del barril formando un “bolsillo de unión a péptidos” (que en lo sucesivo denominaremos “bolsillo”). Esta estructura se ha descrito en la interacción del dominio PDZ1 de EBP50 con otros dominios C-terminales (Karthikeyan et al., 2001b, 2002; Lu et al., 2013).

El péptido LDVYL se inserta en el bolsillo como una hebra adicional anti-paralela a la hebra  $\beta 2$ , mediante el fenómeno de “beta sheet-augmentation” (Fig. 12B). De acuerdo con el valor promedio del coeficiente B de  $17,4$  Å<sup>2</sup> (Tabla 4), LDVYL se encuentra muy ordenado en el interior del bolsillo y oculta aproximadamente unos  $589$  Å<sup>2</sup>, un 66% de la superficie total accesible al solvente ( $892$  Å<sup>2</sup>), indicando que una gran parte de su superficie interacciona con el PDZ1 de EBP50.

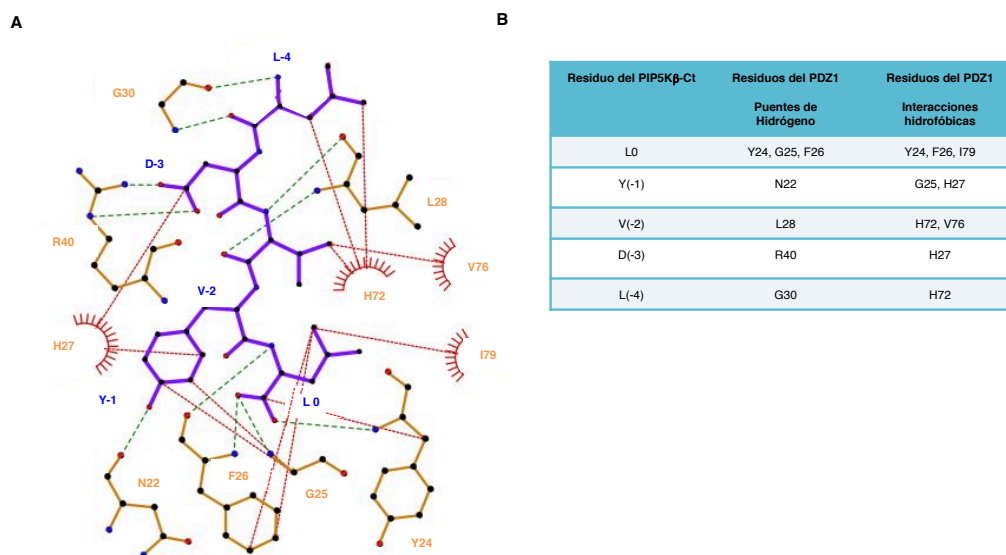
En la estructura cristalina de PDZ1-LDVYL, el péptido C-terminal LDVYL de una molécula de PDZ1 se inserta en el bolsillo de una molécula vecina, la cual recíprocamente, inserta su C-terminal en el bolsillo de la primera, formando un dímero alrededor de un eje de simetría binario (Fig. 12B y C).



**Figura 12.** Estructura de PDZ1 en interacción con el péptido C-terminal de PIP5KI $\beta$  (LDVYL). Diagrama tipo “cartoon” del monómero (A) y del dímero (B) PDZ1-LDVYL. En (A) los residuos en violeta representan el núcleo interior hidrofóbico de la molécula. En (B) se muestra en verde el péptido C-terminal de la PIP5KI $\beta$ . (C) Empaquetamiento cristalino del dímero PDZ1-LDVYL alrededor de un eje de simetría perpendicular al plano de la página y centrado entre los dímeros.

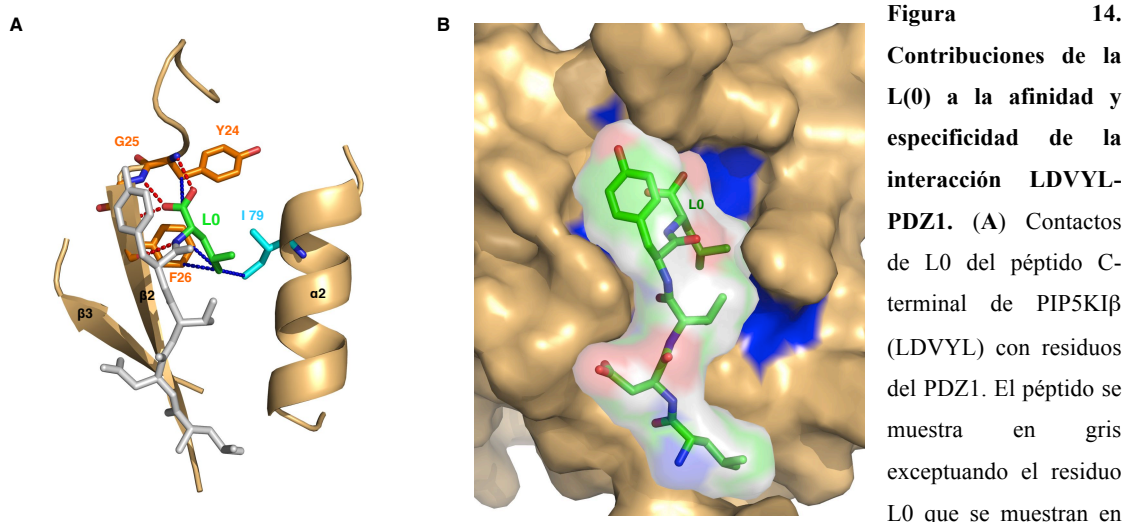
#### 4.1.4. Determinantes estructurales de la afinidad y especificidad de la interacción PDZ1-LDVYL.

Todos los residuos del péptido LDVYL establecen al menos una interacción por puente de hidrógeno con residuos del PDZ1 (Fig. 13) y contribuyen a la afinidad de la interacción. Las contribuciones fundamentales las realizan los grupos carbonilo y amida de las cadenas principales de L0, V(-2) y L(-4). Las cadenas laterales de Y(-1) y D(-3) favorecen el reconocimiento específico del ligando LDVYL por el PDZ.



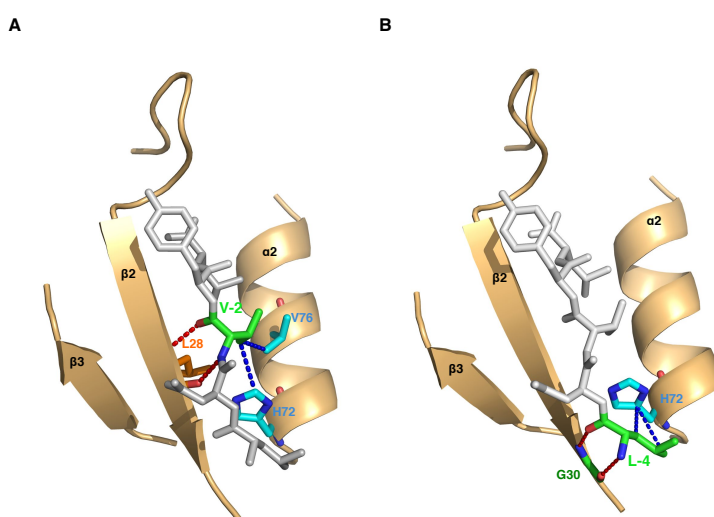
**Figura 13 Representación bidimensional de las interacciones entre el PDZ1 de EBP50 y el C-terminal de PIP5K1β (LDVYL).** (A) Los residuos del péptido LDVYL se representan y se nombran en morado y los del PDZ1 en naranja. Las líneas discontinuas verdes simbolizan interacciones por puentes hidrógeno y las rojas hidrofóbicas. Los arcos radiados indican los residuos implicados en los contactos hidrofóbicos. En cada residuo los círculos negros simbolizan átomos de carbono, los rojos de oxígeno y los azules de nitrógeno. (B) Resumen de los residuos implicados en las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas del PDZ1 con el péptido LDVYL.

La L0 se encaja en el bolsillo hidrofóbico del PDZ1 que está constituido por los residuos altamente conservados Y24, G25 (lazo  $\beta$ 1- $\beta$ 2), F26, L28 (hebra  $\beta$ 2) y V76 e I79 (hélice  $\alpha$ 2) (Fig. 14A y B). El oxígeno carboxílico de L0 forma enlaces de hidrógeno con los nitrógenos amida de G25 y F26, mientras que el oxígeno carbonílico de la L0 forma un puente de hidrógeno con el nitrógeno amida de Y24 (Fig. 14A). Por otra parte, el nitrógeno amida de L0 interacciona mediante un enlace de hidrógeno con el oxígeno carbonílico de F26 (Fig. 14A). El grupo isobutilo de L0 se ajusta estrictamente a las dimensiones de la cavidad hidrofóbica del PDZ1 (Fig. 14B), limitando estéricamente con el anillo bencénico de la F26 y el grupo isobutilo de la I79 (Fig. 14A). El carbono  $C^{\delta 1}$  de L0 establece contactos hidrofóbicos con los átomos  $C^{\epsilon 2}$  y  $C^{\xi}$  del anillo bencénico de F26 y  $C^{\delta}$  de la cadena lateral de I79 (Figs. 13 y 14A); el  $C^{\beta}$  de Y24 interacciona, mediante un contacto hidrofóbico, con el carbono carbonílico de L0 (Fig. 14A). Esta complementariedad estereoquímica podría contribuir al requerimiento estricto de L0 en todos los ligandos con alta afinidad por EBP50-PDZ1 (Hall et al., 1998; Karthikeyan et al., 2001b, 2002; Lu et al., 2013; Mamonova et al., 2012; Raghuram et al., 2001).



verde. Los residuos del PDZ1 implicados en contactos hidrofóbicos e hidrofílicos se muestran en azul y naranja respectivamente, el resto de la estructura del PDZ1 en ocre. Las líneas discontinuas azules y rojas representan los contactos hidrofóbicos e hidrofílicos. (B) Disposición ajustada de L0 en el bolsillo de unión a péptidos del PDZ1. Los residuos hidrofóbicos del bolsillo se muestran en azul y el péptido LDVYL en diagrama de barras y superficie semitransparente.

El nitrógeno amida de V(-2) forma un puente de hidrógeno con el oxígeno carbonílico de L28 mientras el oxígeno carbonílico de V(-2) interacciona mediante un puente de hidrógeno con el nitrógeno amida de L28 (Figs. 13 y 15A). El carbono  $C^{\gamma 1}$  de la cadena lateral de V(-2) forma contactos hidrofóbicos con los carbonos  $C^{\epsilon 1}$  y  $C^{\gamma 1}$  de las cadenas laterales de H72 y V76, respectivamente, de la hélice  $\alpha 2$  (Fig. 15A).



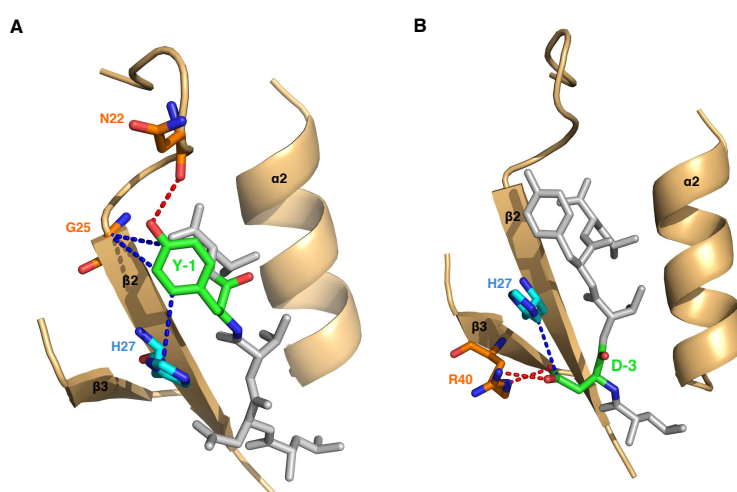
**Fig. 15. Interacciones implicadas en la afinidad del PDZ1 por el péptido C-terminal de PIP5KI $\beta$ .** Se muestran los contactos de V(-2) (A) y L(-4) (B) del péptido LDVYL con los residuos del PDZ1. El péptido se muestra en gris con V(-2) en (A) y L(-4) en (B) en verde. En ambos, los residuos del PDZ1 implicados en contactos hidrofóbicos se muestran en azul y los implicados en contactos

hidrofílicos en naranja, el resto de la estructura se muestra en ocre. Las líneas discontinuas en azul y rojo representan los contactos hidrofóbicos e hidrofílicos respectivamente entre los residuos del péptido LDVYL y el PDZ1.

El oxígeno carbonilo y nitrógeno amida de L(-4) forman puentes de hidrógeno con el nitrógeno amida y oxígeno carbonílico de G30 del lazo  $\beta 2$ - $\beta 3$  (Figs. 13 y 15B). Además de

estas interacciones polares, que contribuyen a la afinidad de la unión PDZ-ligando, los carbonos  $C^\beta$  y  $C^{\delta 1}$  de L(-4) establecen contactos hidrofóbicos con el carbono  $C^\gamma$  de H72 en la hélice  $\alpha 2$  que influyen en el ordenamiento de la cadena lateral de L(-4) en la estructura (Figs. 13 y 15B).

El OH de la cadena lateral de la Y(-1) establece un puente de hidrógeno con el carbono carbonílico de la cadena principal de N22 del PDZ1 (Fig. 16A). La interacción de la Y(-1) con el PDZ1 se estabiliza aún más con los contactos apolares entre los carbonos  $C^{\epsilon 1}$ ,  $C^\theta$  y  $C^{\delta 1}$  del anillo fenólico de Y(-1) y los carbonos  $C^\alpha$  y  $C^\epsilon$  de G25 y H27 del PDZ1, respectivamente (Fig. 16A).



**Figura 16. Interacciones determinantes de la especificidad de la unión PDZ1-LDVYL.**

Contactos establecidos por las cadenas laterales de los residuos Y(-1) (A) y D(-3) (B) con residuos del PDZ1. Los carbonos de Y(-1) y D(-3) se muestran en verde, el resto del péptido en gris. Los carbonos de los residuos del PDZ implicados en contactos polares se representan en naranja y en los contactos apolares en azul. Las

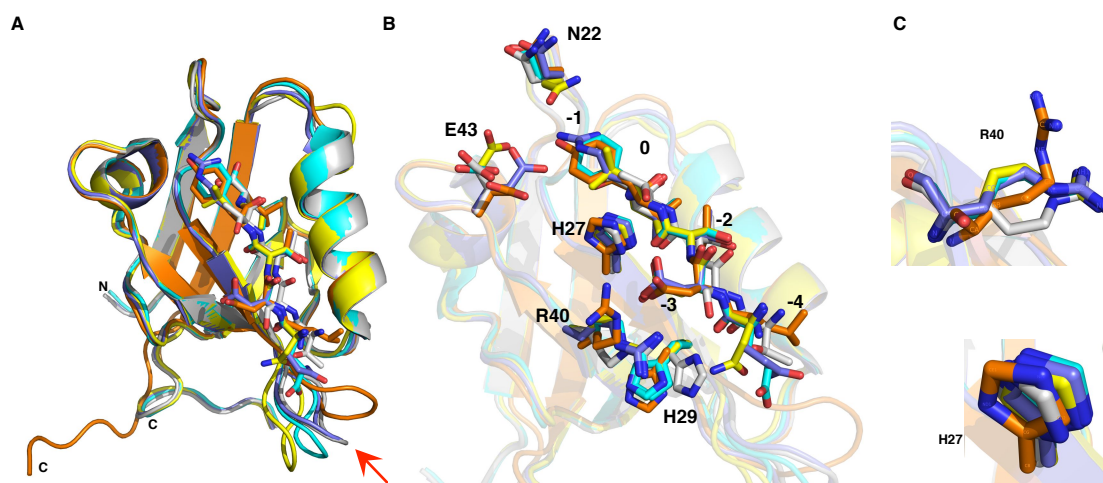
líneas discontinuas azules y rojas entre los residuos del PDZ1 y el péptido LDVYL representan los contactos hidrofóbicos e hidrofílicos respectivamente.

El grupo carboxilato de la cadena lateral del D(-3) establece un puente salino y un puente de hidrógeno con los nitrógenos  $N^\epsilon$  y  $NH_2$ , respectivamente, del grupo guanidinio en la cadena lateral de R40 del PDZ1 (Figs. 13 y 16B). Adicionalmente, el carbono  $C^\gamma$  del D(-3) establece un contacto hidrofóbico con el  $C^\delta$  de la H27 (Figs. 13 y 16B).

A partir del análisis de la estructura podemos inferir que los residuos en las posiciones 0, (-2) y (-4) contribuyen notablemente a la afinidad del C-terminal de PIP5KI $\beta$  (LDVYL) por el PDZ. Los oxígenos carbonílicos y nitrógenos amida de las cadenas principales de L0, V(-2) y L(-4) establecen enlaces de hidrógenos con los correspondientes nitrógenos amida y oxígenos carbonílicos de las cadenas principales de F26, L28 y G30 en la hebra  $\beta 2$  y el lazo  $\beta 2$ - $\beta 3$  del PDZ1 (Fig. 13A). Los residuos en las posiciones (-1) y (-3) favorecen el reconocimiento específico del ligando LDVYL por el PDZ. Las cadenas laterales de Y(-1) y D(-3) establecen contactos polares con R40 y N22 del PDZ1 respectivamente (Fig. 16).

#### 4.1.5. Comparación de la estructura de PDZ1-LDVYL con estructuras resueltas de la interacción de PDZ1 con diversos ligandos.

Con el objetivo de conocer las peculiaridades estructurales que rigen la interacción PIP5KI $\beta$ -EBP50, comparamos mediante alineamiento con el programa Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC), la estructura PDZ1-LDVYL con las de los complejos entre el PDZ1 y los ligandos CXCR2 (Lu et al., 2013), CFTR (Karthikeyan et al., 2001b),  $\beta$ 2AR y PDGFR (Karthikeyan et al., 2002) (Fig. 17A y B). Las cinco estructuras son muy similares, con valores de RMSDs (raíz cuadrada del promedio de la distancia entre los átomos al superponer dos estructuras) para los carbonos alfa de las cadenas principales que oscilan entre 0,31 y 0,42 Å (Tabla 5). Las mayores diferencias se encuentran en el lazo  $\beta$ 2- $\beta$ 3 (Fig. 17A), conformacionalmente más flexible que el resto de la estructura, con valores de factor B en todos los casos por encima del valor promedio para el PDZ (Tabla 5). Las conformaciones de las cadenas principales de los péptidos C-terminales también son muy similares, con valores de RMSD entre 0,033 y 0,104 Å (Tabla 5). Los datos indican que la unión de diferentes péptidos al PDZ1 de EBP50 no afecta el plegamiento general del dominio.



**Figura 17. Alineamiento de las estructuras resueltas del PDZ1 de EBP50 en interacción con diversos ligandos.** (A) Superposición de las estructuras de PDZ1-LDVYL (naranja), PDZ1-CFTR (azul), PDGFR (cian), PDZ1-CXCR2 (gris) y PDZ1- $\beta$ 2AR (amarillo). Los PDZ se representan en diagrama “cartoon” y los ligandos (péptidos C-terminales) en esquema de barras. La flecha roja señala el lazo más flexible  $\beta$ 2- $\beta$ 3. (B) Diferencias conformacionales en las interacciones específicas del PDZ1 con cada ligando. (C) Vista ampliada de las estructuras de R40 y H27 de los 5 PDZ alineados.

**Tabla 5. Desviaciones cuadráticas medias (RMSD) de las cadenas principales de los complejos PDZ1-ligandos alineados estructuralmente con PDZ1-LDVYL.**

PDZ	RMSD(PDZ) (Å)	Secuencia C-terminal	RMSD (C- terminal) (Å)	Factor B lazo $\beta 2$ - $\beta 3$ .	Factor B promedio PDZ
PDZ1-CFTR	0,310	QDTRL	0,033	35,7	34
PDZ1-PDGFR	0,409	EDSFL	0,104	46,2	43,3
PDZ1-CXCR2	0,415	TSTTL	0,053	38,5	38
PDZ1- $\beta 2$ AR	0,416	NDSLL	0,089	24,8	24

Las cadenas laterales de los residuos en las posiciones 0, (-2) y (-3) de los péptidos C-terminales presentan una orientación similar y se superponen en gran medida, sin embargo encontramos mayores desviaciones en la orientación de las cadenas laterales de los residuos en las posiciones (-1) y (-4) (Fig. 17A y B).

Encontramos diferencias importantes en los residuos N22 y E43 del bolsillo de unión a péptidos (Fig. 17B). Observamos que la cadena lateral de N22 adopta dos orientaciones distintas y que la conformación de la cadena lateral de E43 es diferente en las cinco estructuras (Fig. 17B). Como ya mencionamos anteriormente el oxígeno carbonílico de la cadena principal de la N22 forma un puente de hidrógeno con el hidroxilo de la Y(-1) del péptido LDVYL (Fig. 16A). A excepción de T(-1) de CXCR2, las cadenas laterales de los grupos en la posición (-1) del resto de los ligandos se ubican entre los residuos N22 y E43 del PDZ1 (Fig. 17B). Esto nos permite inferir que los cambios conformacionales en estos residuos son los responsables de la flexibilidad del PDZ1 para acomodar diferentes cadenas laterales en la posición (-1) del ligando.

Las mayores diferencias entre las estructuras las encontramos en las conformaciones de las cadenas laterales de R40, H27 y H29 implicadas en interacciones con la posición (-3). Hemos descrito previamente que en PDZ1-LDVYL R40 forma un puente salino y un enlace de hidrógeno con D(-3) (Fig. 16B). Tal orientación supone rotaciones en torno a los enlaces  $C^\alpha$ -C,  $C^\alpha$ - $C^\beta$  y  $C^\delta$ - $N^\epsilon$  en comparación con la disposición en PDZ1-CFTR, PDZ1- $\beta 2$ AR y PDZ1-PDGFR (Fig. 17C). Este cambio conformacional en R40 provoca una rotación de  $180^\circ$  en el enlace  $C^\beta$ - $C^\gamma$  de la H27 (Fig. 17B y C) que aleja su  $N^{\delta_1}$  del oxígeno carbonílico del D(-3) e impide la formación de un puente de hidrógeno entre estos grupos como ocurre en el caso de PDZ1-CFTR, PDZ1- $\beta 2$ AR, PDZ1-PDGFR (Karthikeyan et al., 2001b, 2002). Parece por tanto que R40 del PDZ1 es muy flexible, capaz de explorar un espacio conformacional muy amplio. Los cambios conformacionales en R40 y H27 le permiten al PDZ1 reconocer y acomodar diferentes cadenas laterales en la posición (-3) y a su vez diferenciar un mismo residuo en esta posición en el contexto de diferentes ligandos. En el complejo PDZ1-CXCR2, S(-3) forma un



punto de hidrógeno con H29. La conformación de esta histidina es diferente a la que adopta en el resto de las estructuras (Fig. 17B); el enlace  $C^{\alpha}-C^{\beta}$  rota  $90^{\circ}$  y el anillo imidazólico se acerca al OH de la S(-3) (Fig. 17B) facilitando la interacción del hidroxilo con el  $N^{\delta 1}$  del anillo.

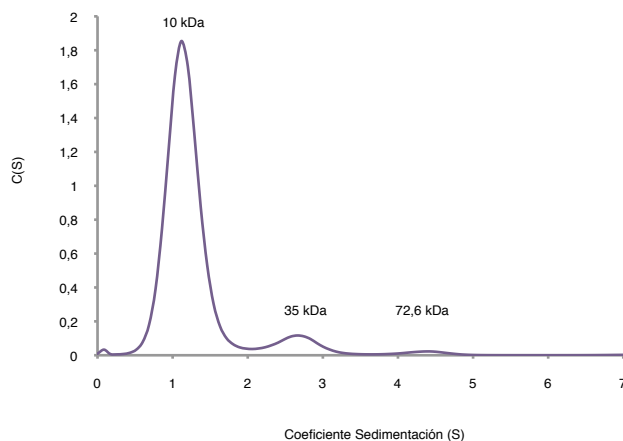
Son por tanto las diferencias conformacionales en unos pocos residuos, las responsables de los cambios en la especificidad de la interacción PDZ1-ligando. La rotación en torno a determinados enlaces en las cadenas laterales de algunos residuos alrededor del bolsillo (N22, E43, R40, H27 y H29) juega un papel fundamental en el reconocimiento y la interacción del PDZ1 de EBP50 con diferentes ligandos.

#### 4.1.6. Cristalización de la proteína PDZ2-LDVYL.

De forma similar a lo realizado con la proteína PDZ1-LDVYL, procedimos a cristalizar la proteína PDZ2-LDVYL purificada. Se utilizaron dos concentraciones de proteína (17 y 7 mg/ml) para la cristalización mediante gota sentada. Se obtuvieron cristales en tres condiciones: 100 mM MES pH 6,5, 30% PEG8000, 200 mM Na(CH<sub>3</sub>COO) (condición 1), 100 mM MES pH 6,5, 30% PEG400, 100 mM Na(CH<sub>3</sub>COO) (condición 2) y 100 mM MES pH 6,5, 30% PEG5000, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (condición 3). En los tres casos los cristales fueron pequeños (5  $\mu$ m x 2  $\mu$ m x 5  $\mu$ m) con forma de prisma de base rectangular.

Para obtener cristales de mayor tamaño se usaron dos aproximaciones a partir de la condición 1: (i) Ligeras variaciones del pH y de la concentración de agentes precipitantes y (ii) adición de alcoholes y/o detergentes a la solución de cristalización. En la aproximación (i) ensayamos 14 nuevas condiciones y obtuvimos cristales solo en una (100 mM MES pH 6,5, 25% PEG8000, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), pero no logramos un incremento apreciable de sus dimensiones respecto a la condición inicial. En el caso de los aditivos, ensayamos 32 nuevas condiciones pero tampoco conseguimos incrementar el tamaño de los cristales.

Con el fin de determinar si los problemas de cristalización estaban relacionados con una baja calidad de la muestra, se analizó la homogeneidad de la preparación de PDZ2-LDVYL por ultracentrifugación analítica, determinando la velocidad de sedimentación por la absorbancia a 230 nm. Los resultados mostraron que ~90% del total correspondía a una proteína de 10 kDa (monómero de PDZ2-LDVYL), un 8% a especies de 35 kDa y un 1,5% a especies de 72,6 kDa (Fig. 18). Estos datos confirman las estimaciones de pureza obtenidas mediante TC (Fig. 10B) y sugieren que la formación de cristales pequeños no es consecuencia de la heterogeneidad de la muestra.



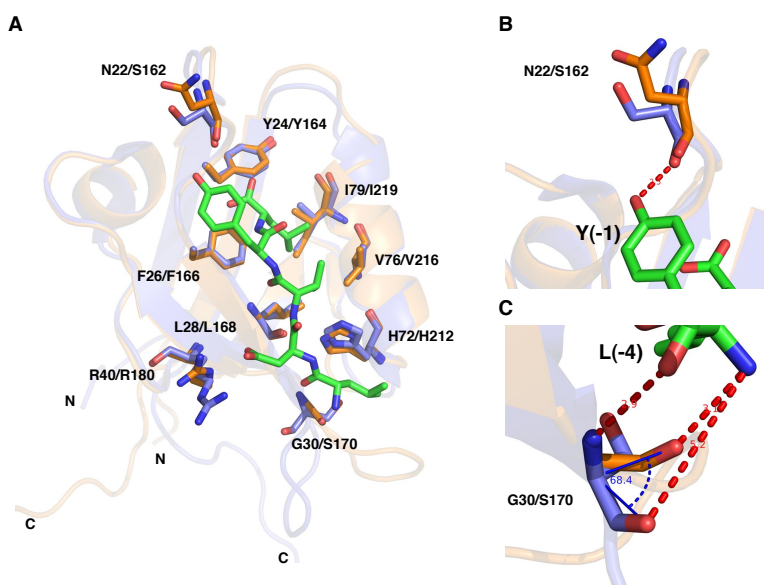
**Figura 18. Determinación de la homogeneidad de la proteína PDZ2-LDVYL mediante ultracentrifugación analítica.** Distribución de tamaños de las especies mediante la representación de la función  $c(s)$  (distribución en el tiempo de la concentración de especies de diferentes tamaño y velocidades de sedimentación, en una región definida de una muestra heterogénea) vs el coeficiente de sedimentación ( $s$ ), para una concentración de

proteína de 1 mg/ml. Resultados similares se obtuvieron para una concentración proteica de 2 mg/ml.

A pesar de sus dimensiones, los cristales de la condición 1 se montaron en criolazos, se congelaron en solución de cristalización con 20% glicerol y se sometieron a difracción en la línea XALOC del sincrotrón ALBA. Los cristales no difractaron y no ha sido posible determinar la estructura cristalográfica del PDZ2 de EBP50 en interacción con el C-terminal de PIP5KI $\beta$ .

#### 4.1.7. Modelización de la interacción del C-terminal de PIP5KI $\beta$ con el PDZ2 de EBP50.

PIP5KI $\beta$  interacciona con PDZ1 y PDZ2 de EBP50 (Mañes et al., 2010). La estructura del dominio PDZ2 de EBP50 ha sido resuelta recientemente (PDB: 2OZF). Para determinar las diferencias estructurales entre ambos dominios PDZ y analizar las implicaciones en la interacción con PIP5KI $\beta$ , alineamos la estructura obtenida del PDZ1-LDVYL con la del PDZ2. Ambas estructuras son muy similares con una RMSD de 0,422 para los carbonos alfa de sus cadenas principales (Fig. 19A).



**Figura 19 Alineamiento estructural de los dominios PDZ1 y PDZ2 de EBP50 con relación al péptido C-terminal de PIP5KI $\beta$ .** (A) Alineamiento de las estructuras de los dominios PDZ1 (naranja) y PDZ2 (azul). Los carbonos del péptido se muestran en verde y los de los residuos del PDZ con los que interacciona, en naranja (contactos hidrofílicos) y en azul (hidrofóbicos) (residuo PDZ1/PDZ2). (B) Representación ampliada de



N22/S162 en el lazo  $\beta 1$ - $\beta 2$  y su interacción con Y(-1). (C) Ampliación de G30/S170 en el lazo  $\beta 2$ - $\beta 3$  y su interacción con L(-4).

Las posiciones de las cadenas laterales de los residuos en el bolsillo se encuentran muy conservadas en ambos casos. Las mayores diferencias las encontramos en el lazo más flexible  $\beta 2$ - $\beta 3$  y en los residuos N22 y G30 del PDZ1, S162 y S170 en PDZ2 (Fig. 19A). La sustitución N22 del PDZ1 con S162 en el PDZ2 es semi-conservativa (cadenas laterales con longitud y orientación semejantes y grupos funcionales COO-NH<sub>2</sub> y OH no cargados), la posición de la cadena principal es la misma en ambos residuos (Fig. 19B). El puente de hidrógeno entre el carbonilo de N22 y el OH de Y(-1) debe mantenerse con el carbonilo de la S162. El acomodo del grupo fenólico de Y(-1) en la estructura sería el mismo (Fig. 19A y B).

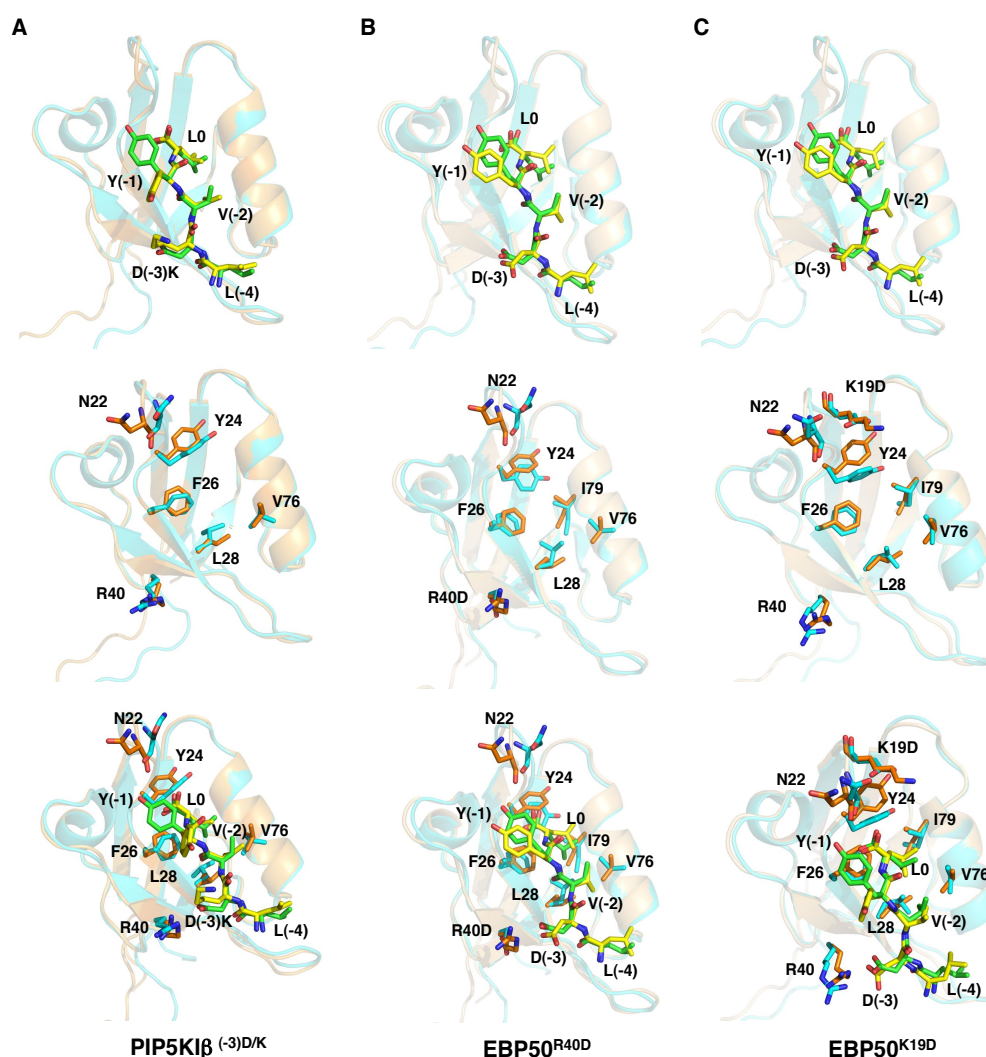
La segunda diferencia está en la posición G30 en PDZ1, S170 en PDZ2. Se trata de una sustitución no conservativa con cadenas laterales de diferente longitud. En PDZ1-LDVYL los enlaces entre G30 y L(-4) se establecen entre los grupos carbonilos y amida de las cadenas principales (Fig. 15B). En el PDZ2 la rotación del enlace C $\alpha$ -NH de S170 alejaría 5,2Å su oxígeno carbonílico del nitrógeno amida de L(-4) (Fig. 19C) y el posible enlace de hidrógeno entre estos residuos se perdería, manteniéndose el del grupo amida de S170 y el carbonilo de L(-4) (Fig. 19C). G30 en PDZ1 y S170 en PDZ2 se encuentran al inicio del lazo  $\beta 2$ - $\beta 3$ ; en PDZ1 esta zona es muy flexible y adopta diversas conformaciones dependiendo del ligando al que se una (Fig. 17A). Algo similar podría ocurrir en el PDZ2, el carbonilo de S170 podría formar el enlace de hidrógeno con el grupo amida de L(-4) y el acomodo del péptido en el PDZ2 sería por tanto muy similar al que tiene lugar en la estructura PDZ1-LDVYL (Fig. 19A).

#### **4.1.8. Análisis estructural de las mutaciones PIP5KI $\beta$ <sup>(-3)D/K</sup>, EBP50<sup>R40D</sup> y EBP50<sup>K19D</sup>. Implicaciones en la interacción.**

La interacción de PIP5KI $\beta$  con EBP50 es clave en la formación del urópodo y en la polarización celular de células leucocitarias (Lacalle et al., 2007; Mañes et al., 2010). Para estudiar esta interacción se había generado un mutante (-3)D/K en el C-terminal de PIP5KI $\beta$  (PIP5KI $\beta$ <sup>(-3)D/K</sup>) y dos mutantes puntuales de sustitución en el PDZ1 de EBP50, R40D (EBP50<sup>R40D</sup>) y K19D (EBP50<sup>K19D</sup>). Mediante ensayos de “pulldown” e inmunoprecipitaciones se había observado una disminución de la interacción de PIP5KI $\beta$ <sup>(-3)D/K</sup> con EBP50, así como de PIP5KI $\beta$  con EBP50<sup>R40D</sup> y EBP50<sup>K19D</sup> (Mañes et al., 2010).

Para analizar estructuralmente el efecto de éstas mutaciones en la interacción PIP5KI $\beta$ -EBP50, modelamos mediante dinámica molecular, la estructura de los tres mutantes, empleando los programas TRITON versión 4 (Prokop et al., 2008) y MODELLER versión 9 (Eswar et al., 2006). En el modelaje se tuvo en cuenta la influencia de la mutación en el acomodo del péptido

en el bolsillo de unión del PDZ. La estructura de los mutantes se ha alineado con la estructura nativa del dímero PDZ1-LDVYL usando el programa Pymol (Fig. 20). En cada mutante el plegamiento general del PDZ1 es muy similar a la molécula nativa, con valores de RMSD de 0,397 a 0,553 (Fig. 20 y Tabla 6) pero se diferencian en las conformaciones de algunos de los residuos del “bolsillo” y del lazo  $\beta$ 1- $\beta$ 2 (Fig. 20). El acomodo del péptido en el PDZ1 es diferente en los tres casos, con valores de RMSD entre 0,148 y 0,353 (Tabla 6); las principales diferencias las encontramos en la conformación de los residuos en las posiciones 0, (-1) y (-3) (Fig. 20).



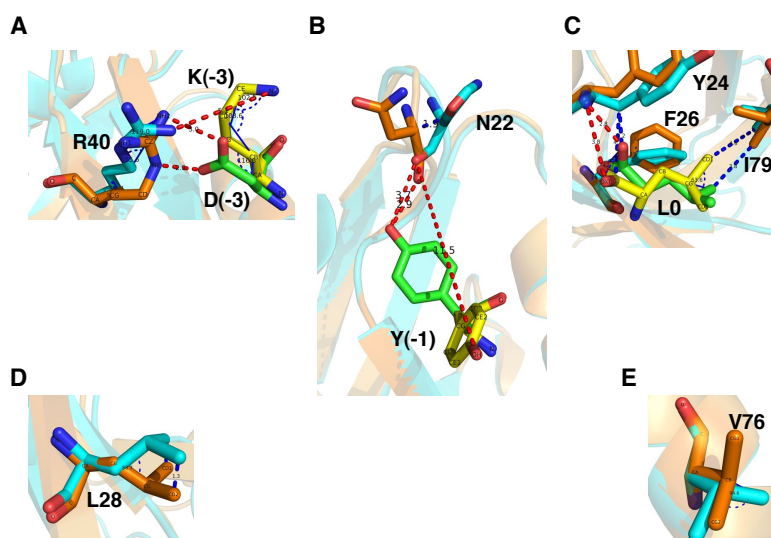
**Figura 20.** Comparación estructural de los mutantes PIP5K1 $\beta$ <sup>(-3)D/K</sup>, EBP50<sup>R40D</sup> y EBP50<sup>K19D</sup> con la estructura nativa PDZ1-LDVYL. Alineamiento de la estructura de PDZ1-LDVYL (ocre) con las de los mutantes (azul) (A) PIP5K1 $\beta$ <sup>(-3)D/K</sup>, (B) EBP50<sup>R40D</sup> y (C) EBP50<sup>K19D</sup>. La primera línea de figuras resalta los residuos del péptido (nativo en verde, mutante en amarillo), la fila intermedia los del bolsillo (nativo en naranja, mutante en azul) y en la fila inferior la combinada.

**Tabla 6. Desviaciones cuadráticas medias (RMSD) de las cadenas principales de los mutantes PIP5KI $\beta^{(-3)D/K}$ , EBP50<sup>K19D</sup> y EBP50<sup>R40D</sup> alineados estructuralmente con PDZ1-LDVYL.**

Mutante	Secuencia C-terminal	RMSD (PDZ1) (Å)	RMSD (C-term) (Å)
PIP5KI $\beta^{(-3)D/K}$	LKVYL	0,456	0,301
EBP50 <sup>R40D</sup>	LDVYL	0,553	0,353
EBP50 <sup>K19D</sup>	LDVYL	0,397	0,148

#### 4.1.8.1 Mutación PIP5KI $\beta^{(-3)D/K}$ .

Ya hemos descrito que el grupo carboxilato del D(-3) del péptido interacciona mediante un puente de hidrógeno y uno salino con el grupo guanidinio de R40 del PDZ1. La sustitución de D por K, en el mutante PIP5KI $\beta^{(-3)D/K}$ , introduce una cadena lateral de similar longitud pero con carga positiva que provoca repulsión con las cargas positivas de R40. Así el grupo NH<sub>2</sub> de K(-3) y los nitrógenos del grupo guanidinio de R40 se alejan situándose a 5,1Å (Fig. 21A). Como resultado el enlace de hidrógeno y el puente salino entre el D(-3) y la R40 se pierden.



**Figura 21.**  
**Diferencias conformacionales inducidas por la mutación PIP5KI $\beta^{(-3)D/K}$ .** Cambios conformacionales que se producen al acomodar el péptido mutante LKVYL en el PDZ1, en los residuos D(-3), K(-3) y R40 (A), Y(-1) y N22 (B),

L0, Y24, F26 e I79 (C), L28 (D) y V76 (E). La estructura nativa del PDZ1 (ocre) y el mutante (-3)D/K (azul) se representan en diagrama “cartoon”. En diagrama de barras los residuos del PDZ1, nativo en naranja y mutante en azul; en el péptido, nativo en verde y mutante en amarillo.

Tabla 7. Residuos que cambian conformacionalmente como resultado de las mutaciones PIP5KI $\beta^{(-3)D/K}$ , EBP50<sup>R40D</sup> y EBP50<sup>K19D</sup>.

Mutante	Residuos en el PDZ1	Residuos en el péptido.
PIP5KI $\beta^{(-3)D/K}$	N22, Y24, F26, L28, R40, V76	K(-3), Y(-1), L0
EBP50 <sup>K19D</sup>	N22, Y24, L28, R40, V76, I79	D(-3), Y(-1), L0
EBP50 <sup>R40D</sup>	N22, Y24, F26, L28, R40, V76, I79	D(-3), Y(-1), L0

Como consecuencia de la repulsión K(-3)/R40 (Fig. 21A) se producen otros cambios estructurales (Fig. 20A y Tabla 7). La cadena principal de N22 se desplaza (Fig. 21B) incrementando la distancia entre el oxígeno carbonílico de N22 y el OH de Y(-1) y el enlace de hidrógeno entre estos grupos se pierde, la cadena lateral de Y(-1) sale del “bolsillo” y se orienta hacia al solvente (Fig. 21B).

La L0 varía la orientación de su cadena lateral en el interior del “bolsillo” (Fig. 21C). El oxígeno carboxílico de L0 se aleja del nitrógeno amida de Y24 y la interacción por puente de hidrógeno entre ambos se pierde. La distancia entre los C <sup>$\gamma$</sup> 1 de L0 e I79 aumenta provocando la pérdida de este contacto hidrofóbico (Fig. 21C).

En el interior del “bolsillo” los anillos de Y24 y F26 rotan, pasando a estar cuasi-perpendiculares al plano de la cadena lateral de L0 y la cadena principal del péptido LKVVYL (Fig. 21C). Mediante la rotación del enlace C <sup>$\alpha$</sup> -C <sup>$\beta$</sup> , el grupo isobutilo de L28 se aleja de su posición original (Fig. 21D), mientras que V76 orienta el C <sup>$\gamma$</sup> 2 hacia el exterior del bolsillo hidrofóbico (Fig. 21E). Como resultado el volumen de la cavidad hidrofóbica disminuye de 677,13 Å<sup>3</sup> a 506,6 Å<sup>3</sup> (Fig. 22A, B y Tabla 8) lo cual dificultaría el acomodo del grupo isobutilo de L0.

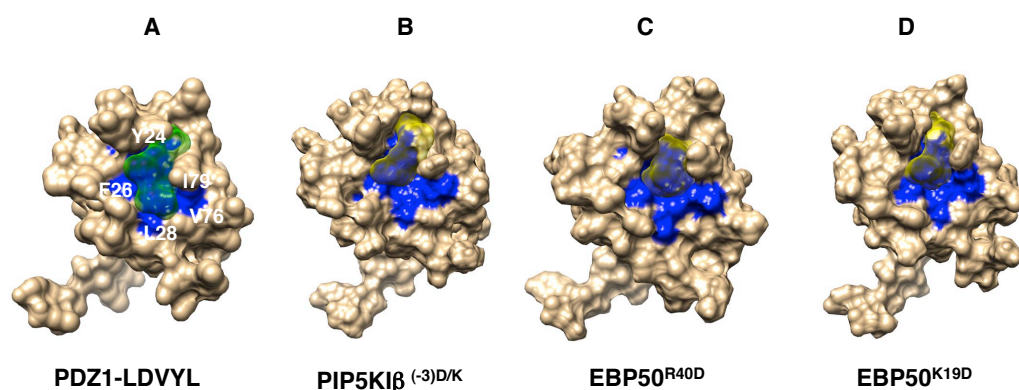


Figura 22. Variaciones en el volumen de la cavidad hidrofóbica del PDZ1 en los mutantes PIP5KI $\beta^{(-3)D/K}$ , EBP50<sup>R40D</sup> y EBP50<sup>K19D</sup>. Representación de superficie del PDZ1 nativo (A) y de los mutantes

PIP5KI $\beta^{(-3)D/K}$  (B), EBP50<sup>R40D</sup> (C) y EBP50<sup>K19D</sup> (D). Los residuos del interior de la cavidad se muestran en azul. El volumen de la cavidad en verde en el PDZ1 nativo y en amarillo en los mutantes.

**Tabla 8. Volumen de la cavidad hidrofóbica de los mutantes**

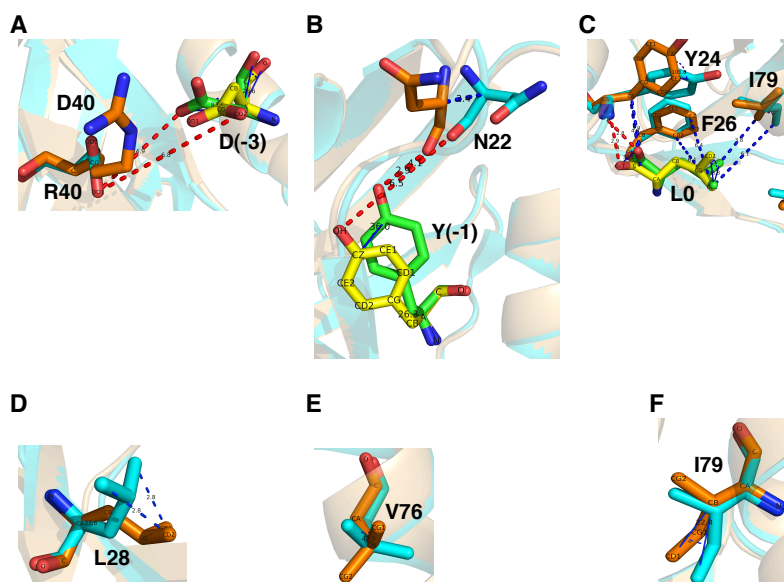
Cavidad (PDZ1)	Volumen (Å <sup>3</sup> )
PDZ1-LDVYL	677,13
PIP5KI $\beta^{(-3)D/K}$	507,3
EBP50 <sup>K19D</sup>	588,51
EBP50 <sup>R40D</sup>	298,18

En resumen, en PIP5KI $\beta^{(-3)D/K}$  la mutación genera repulsión y pérdida de interacción con R40, altera la orientación de las cadenas laterales de Y(-1) y L0, lo que

conlleva la pérdida de interacciones polares e hidrofóbicas con el PDZ1 y dificultades de L0, residuo clave en la interacción, para acomodarse en el “bolsillo”. El menor volumen de la cavidad hidrofóbica, donde L0 se ajusta de manera muy estricta, favorece que se pierda la interacción PIP5KI $\beta^{(-3)D/K}$ -PDZ1.

#### 4.1.8.2 Mutación EBP50<sup>R40D</sup>.

En el mutante EBP50<sup>R40D</sup> la cadena lateral de D40 se orienta en la misma dirección que la de R40 pero se introduce una carga negativa que provoca repulsión entre los grupos carboxilato del D(-3) y del D40 del PDZ1 (Fig. 23A), incrementando la distancia entre los oxígenos carboxílicos de ambos grupos. El enlace de hidrógeno y el puente salino entre el D(-3) y la R40 se pierden.



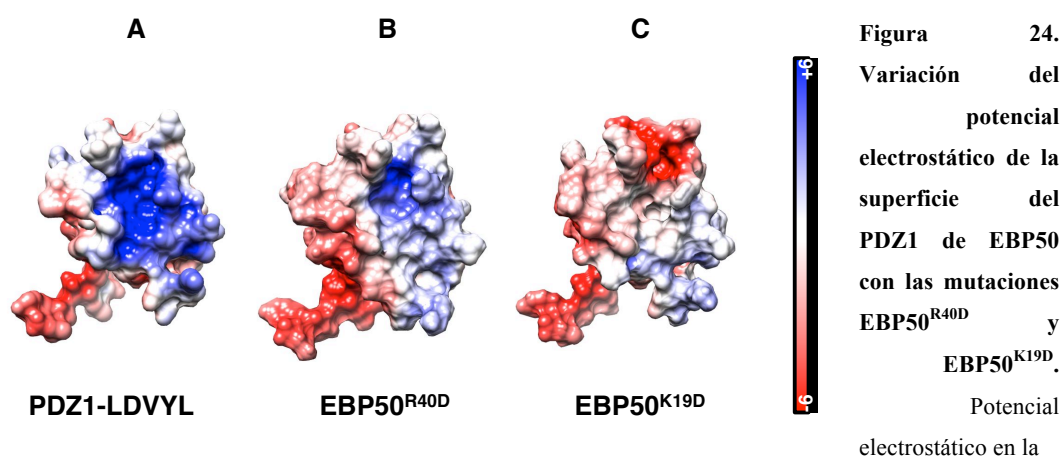
**Figura 23. Cambios conformacionales provocados por la mutación EBP50<sup>R40D</sup> en la interacción PDZ1-LDVYL.** (A) D(-3) y D40, (B) Y(-1) y N22, (C) L0 y Y24, (D) L28, (E) V76 y (F) I79. Los residuos que cambian su conformación se representan en diagrama de barras, los del PDZ1 se

muestran en azul para el mutante y en naranja los de la estructura nativa; los residuos del péptido se muestran con los carbonos del mutante en amarillo y en verde los nativos.

Como resultado de la mutación EBP50<sup>R40D</sup>, la cadena principal de N22 se desplaza, lo que provoca que el oxígeno carbonílico de N22 y el OH de la Y(-1) se separen y se pierda el enlace de hidrógeno entre ambos residuos (Fig. 23B).

El acomodo de la L0 dentro del bolsillo hidrofóbico también cambia (Fig. 23C). La rotación de su cadena principal provoca un incremento de la distancia entre el carbono carbonílico de la L0 y el C<sup>β</sup> de la Y24 del PDZ1 y el contacto hidrofóbico se pierde. El enlace C<sup>β</sup>-C<sup>γ</sup> de L0 gira causando la pérdida de los contactos hidrofóbicos del grupo isobutilo de L0 con los grupos: sec-butilo de I79 y el anillo de F26 (Fig. 23C). Así, L0 pierde todos los enlaces hidrofóbicos que establecía con residuos del bolsillo.

Las conformaciones de los residuos Y24, L28 V76 e I79 también cambian (Fig. 20B y Tabla 7). El plano del anillo fenólico de la Y24 se sitúa en posición cuasi-perpendicular al plano que contiene la cadena lateral de L0 y la cadena principal del péptido (Fig. 23C). Los carbonos del grupo isobutilo de la L28 se separan 2,8 Å de su conformación nativa (Fig. 23D). Los enlaces C<sup>α</sup>-C<sup>β</sup> de V76 e I79 rotan (Fig. 23E y F) y en el caso de V76 el C<sup>δ2</sup> sale del bolsillo hidrofóbico y se orienta al solvente. Debido a estos cambios el volumen de la cavidad hidrofóbica disminuye de 677,14 Å<sup>3</sup> hasta 298,18 Å<sup>3</sup>, lo que dificulta el ajuste de L0 en su interior (Fig. 22A, C y Tabla 8). Además el potencial electrostático en la superficie interior del “bolsillo” cambia y pasa de ser muy a poco cargado positivamente, lo que dificulta el acomodo de la superficie ligeramente negativa del péptido (Fig. 24A y B).



superficie del PDZ1 en la estructura nativa (A) y los mutantes EBP50<sup>R40D</sup> (B) y EBP50<sup>K19D</sup> (C). Las superficies se han coloreado de acuerdo al rango del potencial electrostático (rojo, <-6 kT/e; blanco=0; azul, >6 kT/e donde k=constante de Boltzman, T=temperatura absoluta, e=carga del electrón) calculado de acuerdo al método de Poisson-Boltzman. La barra de colores degradados se corresponde con valores de potencial de -6 kT/e a +6 kT/e.

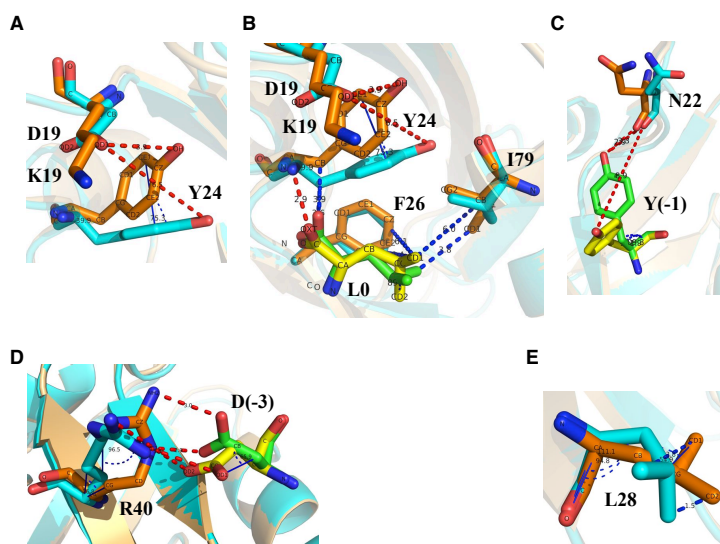


En síntesis, la sustitución R40D en el PDZ1 provoca que el D(-3) del péptido oriente sus cadenas laterales alejando al máximo sus cargas negativas del D40; como consecuencia las cadenas laterales de Y(-1) y L0 varían su orientación y se pierden interacciones polares e hidrofóbicas que son claves para la estabilización del péptido en el PDZ1. La cavidad hidrofóbica también disminuye de volumen y los cambios en su potencial superficial dificultan el acople de L0 en el interior del “bolsillo”. Estos datos explicarían la disminución de la interacción PIP5KI $\beta$ -EBP50<sup>R40D</sup> observada en ensayos de co-IP y pulldown.

#### 4.1.8.3 Mutación EBP50<sup>K19D</sup>.

La K19 se encuentra dentro del llamado lazo de unión al carboxilo cuyos residuos están muy conservados en los dominios PDZ y juegan un papel muy importante en la interacción con el aminoácido en posición 0 del péptido C-terminal.

En el mutante EBP50<sup>K19D</sup>, la cadena lateral de D19 (3 átomos de carbono) se orienta en la misma dirección que la de K19 (5 átomos de carbono) pero es más corta. Debido a repulsiones entre el oxígeno carboxílico del D19 y el OH de Y24 la distancia entre ambos se incrementa (Fig. 25A), el anillo fenólico de Y24 se sitúa perpendicular al plano que contiene la cadena lateral de L0 y la cadena principal del péptido. Sin embargo, el contacto hidrofóbico entre el C $^{\beta}$  de Y24 y el carbono carbonílico de L0, así como el enlace de hidrógeno entre el NH de Y24 y el O $^{\delta_1}$  de L0 no se afectan (Fig. 25B). Los enlaces C $^{\beta}$ -C $^{\gamma}$  de L0 e I79 rotan y el contacto hidrofóbico entre ambos residuos, así como entre L0 y el anillo de F26 se pierden (Fig. 25B). La pérdida de estos contactos hidrofóbicos en el mutante K19D dificulta el encaje de la cadena lateral de L0 en la cavidad hidrofóbica del bolsillo.



**Figura 25. Cambios conformacionales inducidos por la mutación EBP50<sup>K19D</sup> en la interacción LDVYL-PDZ1.** Se muestran los cambios en los residuos (A) K19/D19 y Y24, (B) L0 e I79, (C) Y(-1) y N22, (D) D(-3) y R40 (E) L28. Los residuos del PDZ1 se representan en naranja los de la estructura nativa y en azul los del

mutante; los carbonos del péptido en verde la estructura nativa y en amarillo los del mutante.

La sustitución K19D provoca un incremento de la distancia entre el oxígeno carbonílico de N22 y el OH de la Y(-1) debilitando el enlace de hidrógeno entre estos residuos (Fig. 25C). La tensión conformacional que provoca el giro de la cadena lateral de L0 hace que la Y(-1) oriente su grupo fenólico en dirección al solvente y el enlace de hidrógeno entre Y(-1) y N22 se pierde.

Los cambios conformacionales en la L0 y la Y(-1) del péptido alteran la orientación de las cadenas laterales de D(-3) y R40 (Fig. 25D) provocando un incremento en la distancia entre los oxígenos del D(-3) y los nitrógenos de R40. Como resultado los enlaces de hidrógeno y salino entre ambos residuos se pierden. Por otra parte el enlace  $C^{\beta}-C^{\gamma}$  de L28 rota y los carbonos de su cadena lateral se orientan hacia el exterior del bolsillo (Fig. 25E).

Estos cambios provocan que el volumen del “bolsillo” disminuya de  $677,14 \text{ \AA}^3$  a  $588,51 \text{ \AA}^3$  (Fig. 22A, D y Tabla 7). La introducción de una carga negativa con la mutación K19D hace que el potencial superficial del “bolsillo” pase a ser negativo (Fig. 24C), lo cual dificulta su interacción con el péptido.

En resumen, la mutación EBP50<sup>K19D</sup> provoca cambios conformacionales en la L0 que alteran la orientación de las cadenas laterales de Y(-1) y D(-3) y se pierden contactos claves para la estabilización de las interacciones entre el péptido y el PDZ1. La cavidad hidrofóbica disminuye su volumen y varía el potencial superficial lo cual hace aún más difícil el encaje de L0 en su interior y conlleva en su conjunto la pérdida de la interacción entre PIP5KI $\beta$ -EBP50<sup>K19D</sup>.

Del análisis de las estructuras de los mutantes se derivan tres características comunes: (i) las mutaciones provocan cambios conformacionales en residuos del péptido y del PDZ1 que traen como resultado la pérdida de interacciones fundamentales para la estabilización del péptido en el bolsillo de unión del PDZ1. (ii) Las mutaciones disminuyen el volumen de la cavidad hidrofóbica y dificultan el encaje del residuo clave L0 en su interior, y (iii) Las mutaciones R40D y K19D alteran el potencial superficial del bolsillo de unión a péptidos afectando la disposición del C-terminal de PIP5KI $\beta$  en su interior. Así, la interacción PIP5KI $\beta$ -EBP50-PDZ1 disminuye en los tres casos.

#### **4.2. Purificación de la proteína PIP5KI $\beta$ para la determinación de su estructura cristalográfica.**

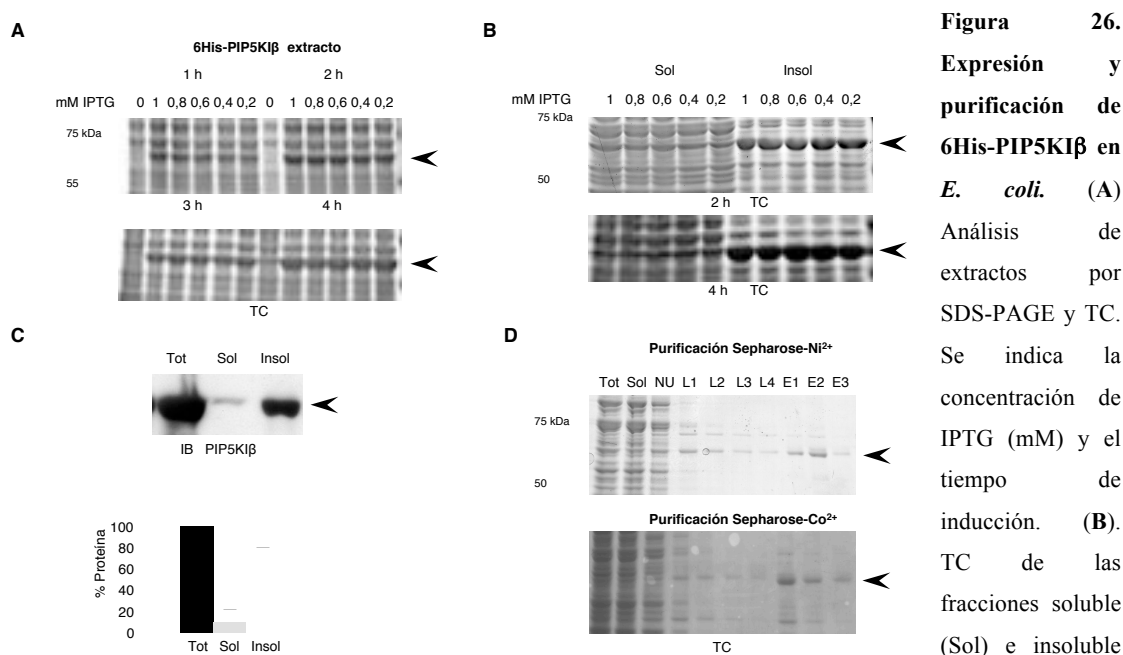
La resolución de la estructura de una proteína a nivel cristalográfico proporciona información valiosa sobre los determinantes estructurales que regulan su función. Las estructuras de las PIP5KI no han sido resueltas por lo que nos planteamos abordar esta cuestión



para la PIP5KI $\beta$ .

#### 4.2.1. Expresión y purificación de PIP5KI $\beta$ en *E. coli*.

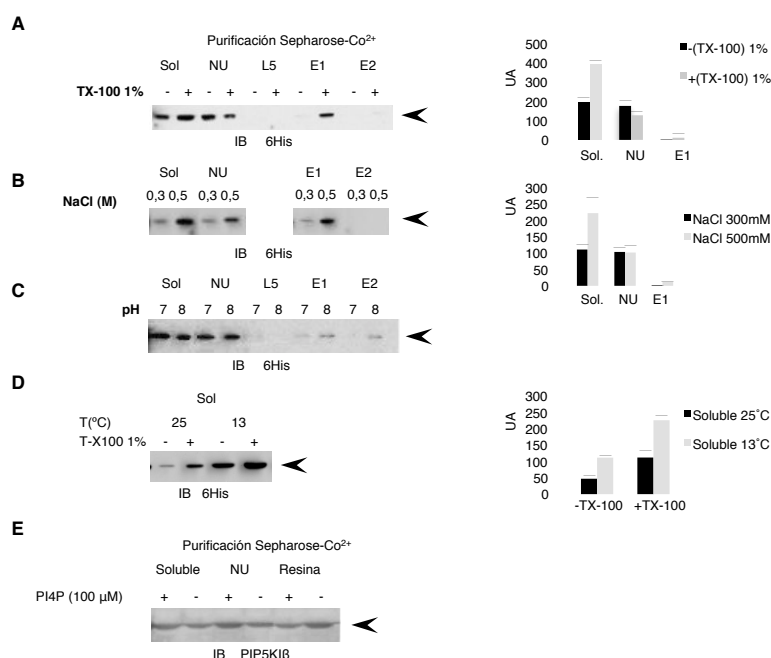
Clonamos y expresamos, bajo el control de un promotor inducible por IPTG, el gen de la PIP5KI $\beta$  con un “tag” de 6 histidinas en su región N-terminal (6His-PIP5KI $\beta$ ), en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)TrxB. Comprobamos la expresión de una proteína de 63 kDa, lo esperado para 6His-PIP5KI $\beta$ , presente solamente en cultivos inducidos (Fig. 26A). Las condiciones óptimas de inducción de la expresión fueron IPTG 0,4 mM y 2 horas, (Fig. 26A). La proteína se expresó a altos niveles ~20  $\mu$ g/ml de cultivo bacteriano (Fig. 26A). La separación de fracción soluble-insoluble mostró que sólo un 9% de 6His-PIP5KI $\beta$  era soluble (Fig. 26B y C).



(Insol) de los extractos inducidos en función de la concentración de IPTG y del tiempo. (C) IB con anti-PIP5KI $\beta$  de las fracciones total (Tot), soluble (Sol) e insoluble (Insol) del lisado bacteriano inducido con 0,4mM IPTG durante 2 horas. Cuantificación de la proteína 6His-PIP5KI $\beta$  por densitometría. (D) Purificación de 6His-PIP5KI $\beta$  con las resinas Sepharose-Ni $^{2+}$  y Sepharose-Co $^{2+}$ . Fracciones: total (Tot), soluble (Sol), no unido (NU), lavados 1 al 4 (L1-L4) y eluidos 1 al 3 (E1-E3). Se muestra un experimento representativo de 3. La flecha indica la posición de 6His-PIP5KI $\beta$ .

La purificación de la fracción soluble de la proteína se realizó mediante cromatografía de afinidad empleando las resinas Sepharose-Co $^{2+}$  o Sepharose-Ni $^{2+}$  (Fig. 26D) y se eluyó con imidazol. La cantidad de PIP5KI $\beta$  así semipurificada, según cuantificación en gel, fue de ~800 ng/ml de cultivo en ambos casos. Ya que la purificación con ambas resinas tuvo un comportamiento similar, continuamos el proceso con Sepharose-Co $^{2+}$ .

Analizamos el efecto de la adición del detergente Tritón X-100 (TX-100), la fuerza iónica, el pH y la temperatura de inducción en la solubilidad de la proteína, la unión y elución de la resina. La adición de TX-100 1% incrementó ~2 veces la solubilidad y la unión a la resina obteniendo 1,12  $\mu\text{g/ml}$  de cultivo bacteriano de 6His-PIP5KI $\beta$  (Fig. 27A). El uso de 500 mM NaCl, mejoró la solubilidad, la unión y la elución de la proteína con rendimiento de 1,2  $\mu\text{g/ml}$  cultivo. (Fig. 27B). El punto isoeléctrico de 6His-PIP5KI $\beta$  es 6,58; el uso de pH 8 permitió tener un rendimiento de 1,15  $\mu\text{g/ml}$  de cultivo (Fig. 27C). Al inducir la expresión de 6His-PIP5KI $\beta$  a baja temperatura (13°C) se incrementó la solubilidad 2 veces, con o sin TX-100 1% (Fig. 27D). Así escogimos como tampón de purificación, 50mM Tris , pH 8, 500 mM NaCl, TX-100 1%, 10 mM imidazol. Lavamos en el mismo tampón con 20 mM imidazol y eluimos con 500 mM imidazol obteniendo un rendimiento de 1,6  $\mu\text{g/ml}$  de cultivo.



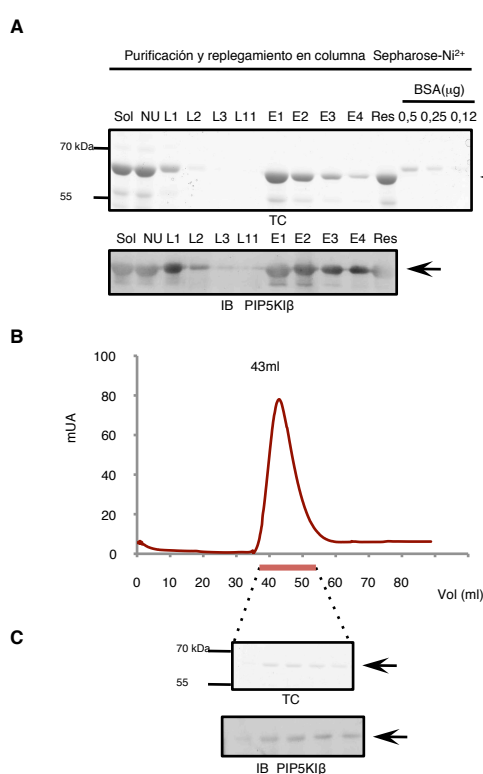
**Figura 27. Efecto del detergente, la fuerza iónica, el pH, la temperatura de inducción y la adición de PI4P, en la purificación de 6His-PIP5KI $\beta$ .** (A) Adición de TX-100 1%, (B) Efecto de la fuerza iónica, (C) Efecto del pH. Se muestra el análisis de las fracciones Sol, NU, L5, E1 y E2 mediante IB con anti-6His y la cuantificación por densitometría. (D) IB con anti-6His de la fracción soluble de extractos de

cultivos bacterianos inducidos a 13 °C y 25 °C en presencia y ausencia de TX-100 1%. (E). IB con anti-PIP5KI $\beta$  de las fracciones Sol, NU, y unido a resina (Resina) de la purificación de 6His-PIP5KI $\beta$  en ausencia (-) o presencia (+) de PI4P. En cada caso se muestra un experimento representativo de 3. Las flechas indican la posición de 6His-PIP5KI $\beta$ .

Para aumentar la solubilidad y el rendimiento de la purificación añadimos el sustrato de la enzima, fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P) durante el proceso. Empleamos la concentración de PI4P (200  $\mu\text{M}$ ) utilizada en ensayos de actividad quinasa *in vitro*. Observamos que la adición del lípido no mejoró ni la solubilidad ni el rendimiento de la purificación (Fig. 27E).

Ya que gran parte de la proteína expresada en *E. coli* se produce insoluble como cuerpos de inclusión, pasamos a purificar 6His-PIP5KI $\beta$  a partir de esta fracción que contiene ~40  $\mu\text{g/ml}$  de cultivo de proteína insoluble. La proteína se desnaturizó con urea 8 M, se

purificó por cromatografía de afinidad (Sephacrose-Ni<sup>2+</sup>) y se renaturalizó en columna por dilución, hasta eliminar la urea. Obtuvimos 23 mg de proteína desnaturalizada, 13,4 mg se unieron a la resina y eluimos 7,2 mg de proteína soluble (Fig. 28A). El rendimiento del proceso fue del 31,3%. Posteriormente se utilizó una columna Superdex S-200 para purificar 6His-PIP5KI $\beta$  a homogeneidad por cromatografía de exclusión molecular (Fig. 28B). El cromatograma mostró un pico con un volumen de exclusión de 43 ml (volumen muerto de la columna), que corresponde a proteínas de peso molecular >600 kDa (Fig. 28B). El análisis de las fracciones 1 a 6 (40-52 ml) reveló una banda de 63 kDa tanto por SDS-PAGE como por IB con anti-PIP5KI $\beta$  (Fig. 28C). El hecho de que la proteína eluya fuera del límite de exclusión de la columna S-200 sugiere la formación de agregados, probablemente como consecuencia de un inadecuado proceso de renaturalización.



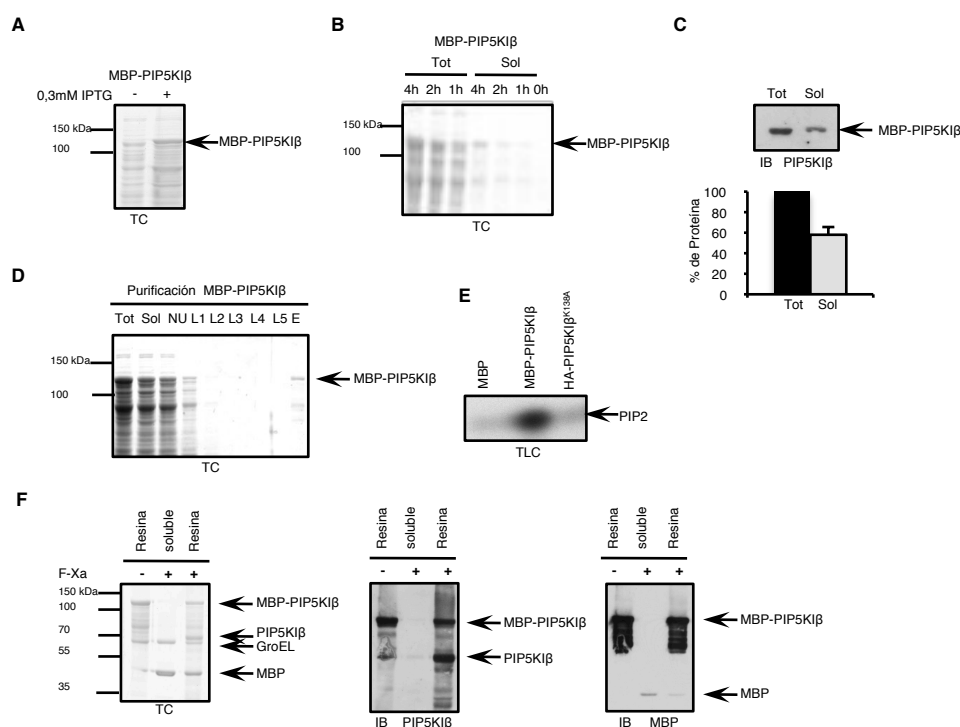
**Figura 28 Purificación de 6His-PIP5KI $\beta$  a partir de cuerpos de inclusión.** (A) Cromatografía de afinidad Sepharose-Ni<sup>2+</sup> y renaturalización en columna de 6His-PIP5KI $\beta$ . Se muestra TC e IB con anti-PIP5KI $\beta$  de la proteína purificada y renaturalizada. (B) Cromatograma de elución de 6His-PIP5KI $\beta$  en columna Superdex S-200. Volumen de elución (ml) respecto a la absorbancia en unidades arbitrarias (mUA). (C) TC e IB con anticuerpo anti PIP5KI $\beta$  de las fracciones 1 a 6 correspondientes al pico con volumen de elución 43 ml. Las flechas señalan la posición de 6His-PIP5KI $\beta$ . Se muestra un experimento representativo de 2.

Las numerosas pruebas y condiciones ensayadas no mejoraron el rendimiento de la purificación de 6His-PIP5KI $\beta$  de forma significativa como para permitir la purificación a gran escala, por lo que concluimos que este sistema de expresión no era idóneo para la purificación de PIP5KI $\beta$  con vistas a su cristalización.

#### 4.2.2. Expresión y purificación de PIP5KI $\beta$ como proteína de fusión a “Maltose Binding Protein” (MBP).

La expresión de una proteína en fusión con una chaperona puede contribuir al correcto plegamiento y solubilidad de la misma. Tal es el caso de la “Maltose Binding Protein” (MBP) (Kapust and Waugh, 1999; Raran-Kurussi and Waugh, 2012), que además se emplea como “tag” para la purificación aprovechando su afinidad por la amilosa.

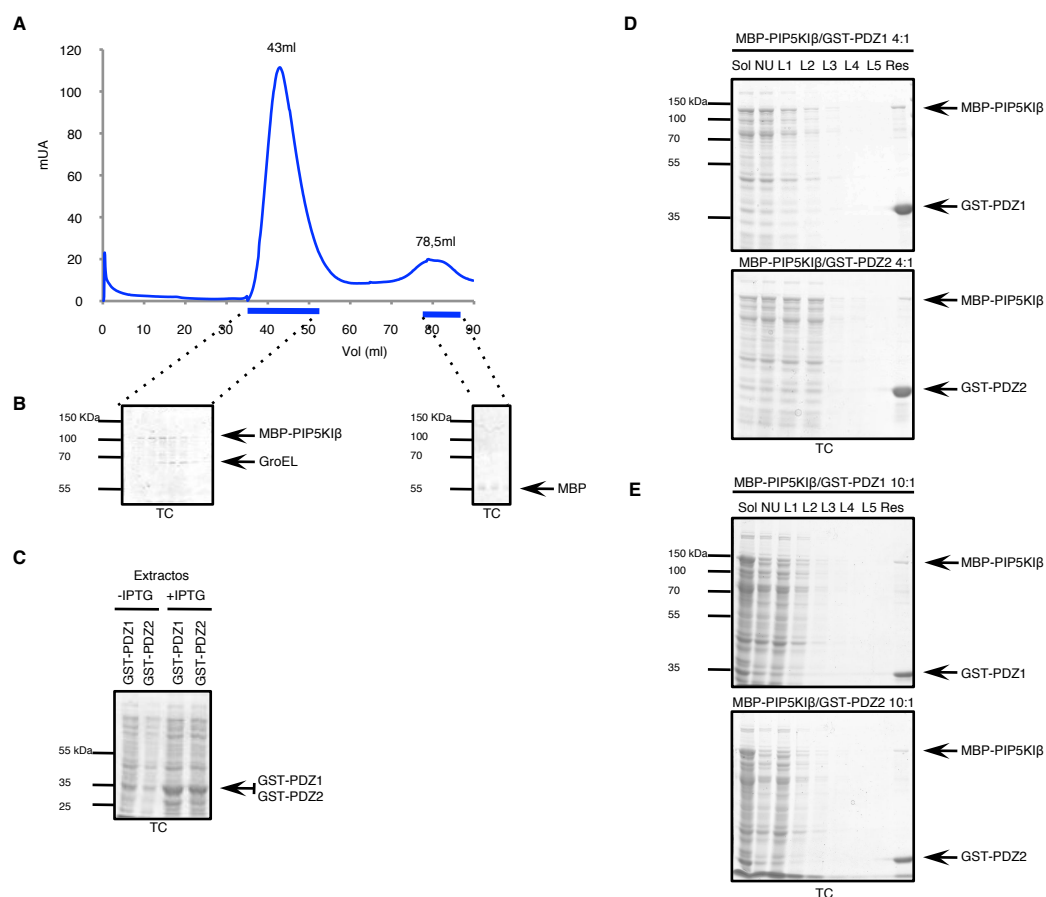
Clonamos y expresamos la PIP5KI $\beta$  en el plásmido pMal-c5X en fusión con MBP en el N-terminal de PIP5KI $\beta$  y con un sitio de reconocimiento para el Factor Xa (F-Xa). Los lisados de los cultivos de *E. coli* BL21(DE3)TrxB transformados con pMal-c5X-PIP5KI $\beta$  mostraron la expresión de una proteína de 107 kDa, correspondiente a la proteína de fusión (MBP-PIP5KI $\beta$ ), tras la inducción con IPTG (0,3 mM). MBP-PIP5KI $\beta$  se expresó a altos niveles, ~20  $\mu$ g/ml de cultivo (Fig. 29A). El tiempo óptimo de inducción de MBP-PIP5KI $\beta$  fue 4 horas (Fig. 29B). Aproximadamente el 40% del total de MBP-PIP5KI $\beta$  permaneció en la fracción soluble (Fig. 29C). Purificamos MBP-PIP5KI $\beta$  por cromatografía de afinidad con “Sepharose-Amilose” y obtuvimos 2,5  $\mu$ g de proteína eluída/ml de cultivo (Fig. 29D). La proteína unida a la resina resultó ser activa en un ensayo de actividad quinasa, según se determinó por la presencia de banda radioactiva, con Rf correspondiente al PIP2, en cromatografía en capa fina (Fig. 29E). La digestión de MBP-PIP5KI $\beta$  unida a la resina con F-Xa, liberó dos proteínas: una de 60 kDa, identificada por huella peptídica mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) como GroEL, y otra de ~45 kDa que resultó ser MBP, identificada en IB (Fig. 29F). La PIP5KI $\beta$  no se detectó en la fracción soluble sino asociada a la resina (Fig. 29F). La eliminación del tag MBP hace que la PIP5KI $\beta$  se insolubilice, posiblemente al separarse del complejo donde está la chaperonina GroEL.



**Figura 29. Expresión y purificación de MBP-PIP5KIβ.** (A) Inducción de la expresión de MBP-PIP5KIβ en cultivos de *E. coli* con 0,3mM IPTG. (B) TC de las fracciones total y soluble de un cultivo inducido a 0,3mM IPTG durante 0, 1, 2 y 4 horas. (C) IB de las fracciones total y soluble de un cultivo inducido a 0,3mM IPTG y 4 h. (D) Purificación de la proteína MBP-PIP5KIβ con Sepharose-Amylose. TC de las fracciones indicadas. (E) Ensayo quinasa de MBP-PIP5KIβ. Cromatografía en capa fina de la reacción donde se muestra la señal radiactiva con Rf correspondiente al PIP2. Como controles negativos se usaron MBP, y el mutante catalíticamente inactivo HA-PIP5KIβ<sup>K138A</sup>. (F) Digestión de MBP-PIP5KIβ por (F-Xa). TC e IB con anti-PIP5KIβ y anti-MBP de las muestras antes (-) y después (+) de la digestión. Se muestra un experimento representativo de 3.

La cristalización de proteínas en fusión con MBP ha sido descrita y MBP permite el correcto plegamiento de las mismas (Moon et al., 2010; Smyth et al., 2003). Decidimos cristalizar la proteína de fusión MBP-PIP5KIβ que mantiene su actividad enzimática lo que sugiere un adecuado plegamiento de la quinasa. La proteína purificada por cromatografía de afinidad con “Sepharose-Amylose” se eluyó con 100 mM maltosa, obteniéndose 2,5 µg/ml de cultivo. A continuación se purificó en una columna de exclusión molecular (Superdex S200) (Fig 30A). Observamos un pico de elución con un volumen de exclusión de 43 ml, que corresponde a proteínas de peso molecular > 600 kDa, y un segundo pico en 78,5 ml (Fig. 30A). No se observó pico en el volumen esperado para MBP-PIP5KIβ (67 ml). El análisis de las fracciones del pico de 43 ml, reveló dos bandas de pesos moleculares de 107 kDa y 60 kDa correspondientes a MBP-PIP5KIβ y GroEL, respectivamente (Fig. 30B). Al analizar el pico de 78,5 ml se detectó una proteína de 42 kDa que se corresponde a MBP, co-purificada por afinidad y co-eluida con MBP-PIP5KIβ. La co-elución de MBP-PIP5KIβ y GroEL fuera del

límite de exclusión de la columna S200 sugiere la formación de un agregado ó de un multímero soluble de MBP-PIP5KI $\beta$  y la chaperonina GroEL, lo que imposibilita el uso de esta aproximación para la cristalización de PIP5KI $\beta$ .



**Figura 30. Purificación de MBP-PIP5KI $\beta$  y los complejos MBP-PIP5KI $\beta$ /GST-PDZ1 y MBP-PIP5KI $\beta$ /GST-PDZ2 . (A-B)** Cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex S-200 de la proteína MBP-PIP5KI $\beta$ . (A) Volumen de elución (ml) respecto a la absorbancia en unidades arbitrarias (mUA). Se indica el volumen del centro del pico en cada caso. (B) TC de las fracciones de los picos en (A). (C) Expresión de GST-PDZ1 y GST-PDZ2. (D, E) Purificación con resina “Glutathione-Sepharose” de los complejos MBP-PIP5KI $\beta$ /GST-PDZ1 y MBP-PIP5KI $\beta$ /GST-PDZ2 en proporción molar 4:1(D) y 10:1(E). En cada caso se muestra TC de las fracciones indicadas en un experimento representativo de 3.

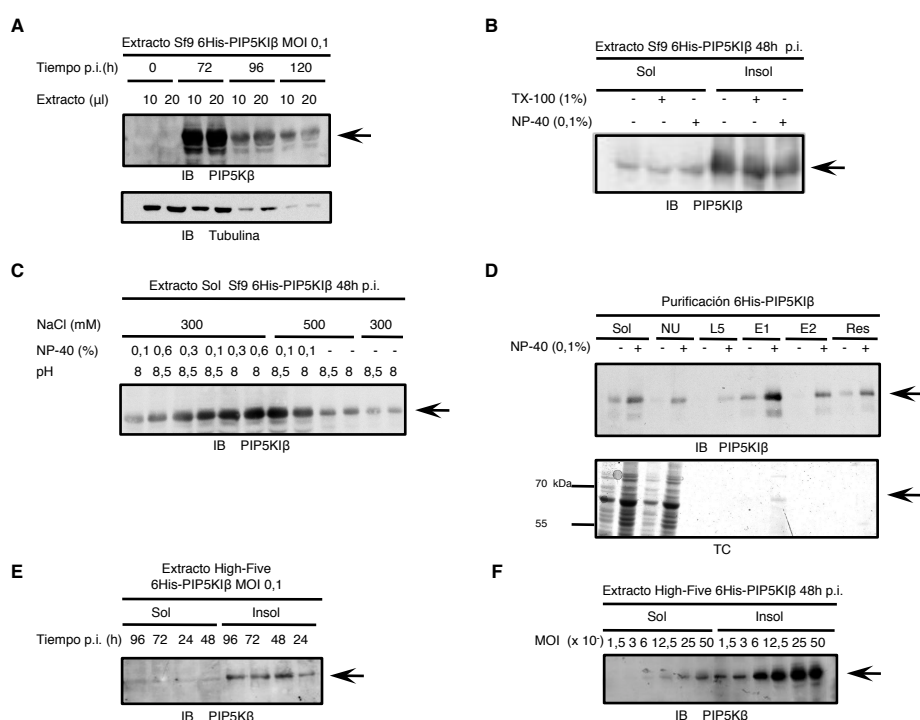
La interacción entre proteínas puede estabilizar conformaciones más solubles y/o prevenir su agregación, ocultando regiones propensas a interactuar entre sí (Sennhauser and Grutter, 2008). Decidimos co-purificar MBP-PIP5KI $\beta$  formando complejo con el dominio PDZ1 o PDZ2 de EBP50. Indujimos la expresión de GST-PDZ1 y GST-PDZ2 en *E. coli* BL21(DE3)TrxB con IPTG 0,3 mM durante 3 horas. Los lisados bacterianos mostraron GST-PDZ1 y GST-PDZ2 (35 kDa) a ~20  $\mu$ g/ml cultivo solo en cultivos inducidos (Fig. 30C). La fracciones solubles de cultivos independientes de MBP-PIP5KI $\beta$ , GST-PDZ1 y GST-PDZ2 se incubaron 3 horas a 4°C en proporción molar 4:1 (MBP-PIP5KI $\beta$ /GST-PDZ). Los complejos se

purificaron mediante cromatografía de afinidad con la resina “Glutathione-Sepharose” (Fig. 30D). Obtuvimos ~125 ng/ml de cultivo de cada complejo lo que representa un rendimiento de 0,625%. Este bajo rendimiento, que impidió escalar la purificación, no mejoró al aumentar la proporción molar de MBP-PIP5KI $\beta$ /GST-PDZ1 o GST-PDZ2, hasta 10:1, ni el tiempo de interacción hasta 8 horas (Fig. 30E); descartamos por tanto esta aproximación como herramienta para la purificación de PIP5KI $\beta$ .

#### 4.2.3. Expresión y purificación de PIP5KI $\beta$ en Baculovirus.

Ya que la producción de PIP5KI $\beta$  en *E. coli* no nos permitía abordar la purificación de miligramos de proteína necesaria para la cristalización, decidimos utilizar el sistema de Baculovirus para la expresión de la proteína en células de ovario de insecto.

Se clonó el gen de la PIP5KI $\beta$  en el vector pAcHLT-C y se co-transfectaron las células Sf9 con el ADN viral y el pAcHTL-C-PIP5KI $\beta$ ; por recombinación se obtuvo el virus infeccioso que expresa la proteína PIP5KI $\beta$  en fusión con un “tag” de 6His en la región N-terminal (6His-PIP5KI $\beta$ ).



**Figura 31. Expresión y purificación de 6His-PIP5KI $\beta$  en células Sf9 y High-Five.** (A) IB con anti-PIP5KI $\beta$  y anti-tubulina de lisados de células Sf9 infectadas con Baculovirus recombinante a MOI 0,1 y diferentes tiempos post-infección (p.i.). (B) Efecto de detergentes en la solubilidad de 6His-PIP5KI $\beta$  expresada en Sf9. IB anti-PIP5KI $\beta$  de las fracciones soluble e insoluble de lisados de cultivos a 48 h p.i. (C) Determinación de la condición de lisis óptima de Sf9-6His-PIP5KI $\beta$ . IB anti-PIP5KI $\beta$  de la fracción soluble a 48 h p.i. (D) Purificación por cromatografía de afinidad “Sepharose-Co<sup>2+</sup>” de 6His-PIP5KI $\beta$  expresada en células Sf9 a 48 h p.i. IB anti-PIP5KI $\beta$  (panel superior) y

TC. (E) IB con anti-PIP5KI $\beta$  de las fracciones soluble (Sol) e insoluble (Insol), de células High-Five infectadas a MOI 0,1 durante 24, 48, 72 y 96 horas. (F) Como en (E) pero infectando las células a diferentes MOI durante 48 horas. En cada caso se muestra un experimento representativo de un mínimo de 3.

Analizamos la expresión de 6His-PIP5KI $\beta$  en lisados de células Sf9 infectadas con índice de multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 a las 48, 72 y 96 h posteriores a la infección (p.i.). Los IB con anticuerpo anti-PIP5KI $\beta$  mostraron una banda de 65 kDa correspondiente a 6His-PIP5KI $\beta$  (Fig. 31A) con un máximo a las 72 horas p.i., tiempo a partir del cual comenzó a disminuir. La cantidad de proteína total disminuyó en la misma proporción, según se verificó al revelar los extractos con un anticuerpo anti-tubulina (Fig. 31A). Esto se debe a un incremento de la muerte celular a partir de las 72 h p.i., lo que sugería una posible toxicidad de la proteína 6His-PIP5KI $\beta$  en las células Sf9 y nos obligó a trabajar a 48 h p.i. Se obtuvieron 4  $\mu$ g de 6His-PIP5KI $\beta$ /10<sup>6</sup> células Sf9.

Ensayamos el efecto de los detergentes TX-100 1% y NP-40 0,1% en el tampón de lisis; al usar NP-40 0,1% recuperamos la mayor cantidad de proteína soluble (~20%) (Fig. 31B). Variamos también la fuerza iónica y la concentración del NP-40. Escogimos el tampón 50 mM Tris, pH 8, 500 mM NaCl, NP-40 0,1% al ser la condición que permitió recuperar una mayor cantidad de proteína soluble (5,5  $\mu$ g de proteína/10<sup>6</sup> células Sf9) con la menor concentración de detergente (Fig. 31C). La proteína se purificó por afinidad obteniendo un rendimiento de aproximadamente 13,5  $\mu$ g/10<sup>7</sup> células (Fig. 31D).

La infección de células Sf9 a gran escala requiere un stock viral de baculovirus con alto título (>10<sup>8</sup> pfu/ml). La expresión de la proteína GFP por el baculovirus nos permitió determinar el título por citometría de flujo a 24-36h p.i. (Gueret et al., 2002) que resultó de 10<sup>5</sup> pfu/ml. Sin embargo, tras dos rondas sucesivas de amplificación viral y de usar diferentes MOI y tiempos, obtuvimos un título  $\leq 1,5 \times 10^6$  pfu/ml. Este resultado refuerza la idea de que PIP5KI $\beta$  es tóxica en Sf9 y afecta la formación de partículas virales. Los intentos de amplificación, utilizando células Sf9 en suspensión arrojaron resultados similares, con títulos de 10<sup>6</sup> pfu/ml y muerte celular a las 72 h p.i. El bajo título viral nos obligó a trabajar a MOIs  $\leq 0,1$ ; no logramos incrementar el rendimiento de proteína soluble purificada, lo cual hizo inviable el escalado.

Como alternativa a Sf9 usamos la línea celular High-Five de ovario de *Trichopulsia ni*, descrita como buena productora de proteínas intracelulares (Hu, 2005; Palmberger et al., 2011). Verificamos por IB la expresión de la proteína soluble a diferentes tiempos p.i. (MOI 0,1) (Fig. 31E). El rendimiento de la producción de 6His-PIP5KI $\beta$  no mejoró con respecto a las células Sf9. También observamos muerte celular a las 72 horas p.i. y no logramos incrementar la expresión de proteína soluble a 48h p.i. y diferentes MOI (Fig. 31F). El probable efecto tóxico que tiene la sobreexpresión de la quinasa en estas células impide el uso del sistema de baculovirus para la producción masiva de PIP5KI $\beta$ .

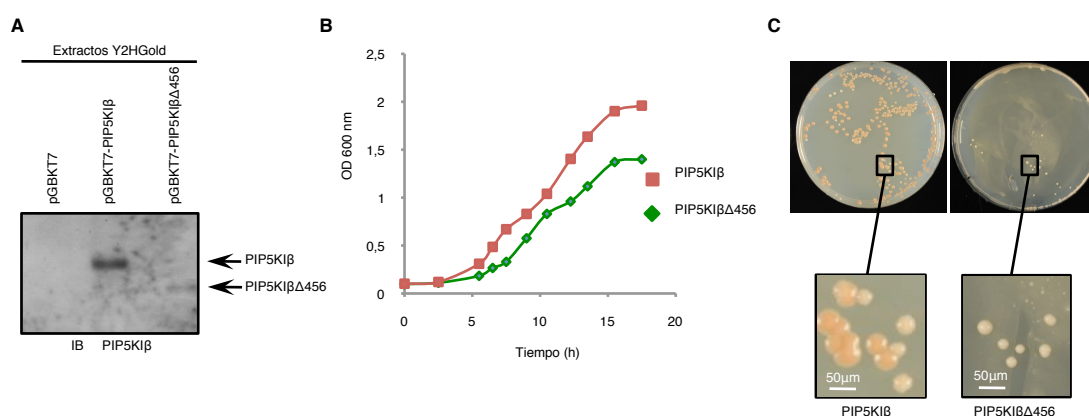


### 4.3. Identificación de nuevas proteínas de interacción con PIP5K1 $\beta$ .

Decidimos profundizar en la función de PIP5K1 $\beta$  mediante la identificación de nuevas proteínas que interaccionaran con la misma.

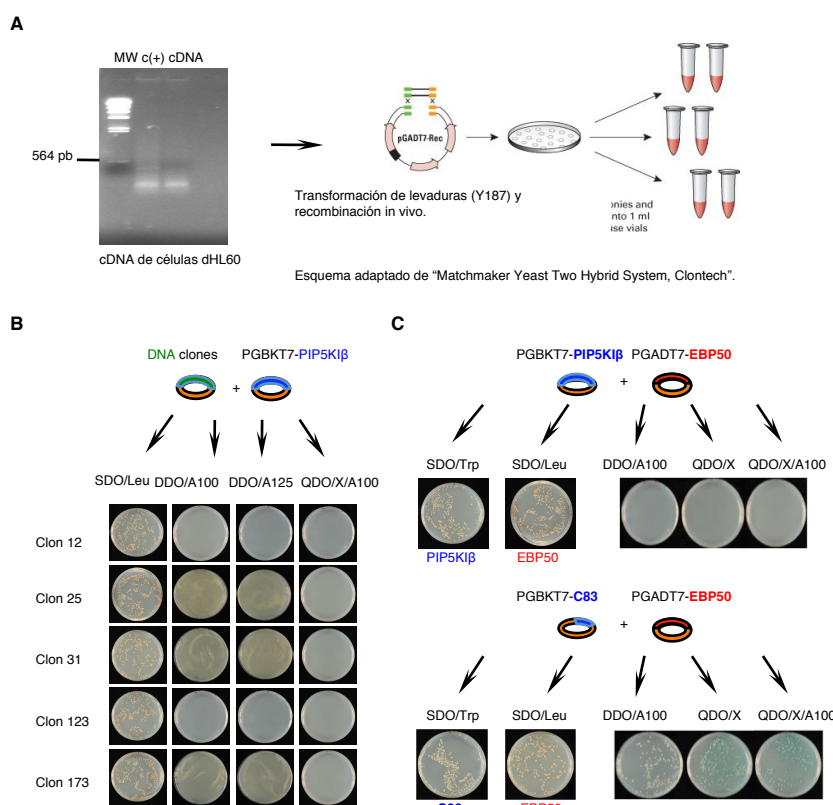
#### 4.3.1. Búsqueda de proteínas de interacción con PIP5K1 $\beta$ con el sistema de levadura de “Doble Híbrido”.

Realizamos un estudio de dobles híbridos en levadura empleando el sistema “Matchmaker Yeast Two-Hybrid System” (Clontech). La proteína PIP5K1 $\beta$  completa y el mutante que carece de los últimos 83 aminoácidos de la región C-terminal (PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 456) se emplearon como “cebo”. Clonamos PIP5K1 $\beta$  y PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 456 en el plásmido PGBKT-7 como proteínas de fusión al dominio de unión a ADN del factor de transcripción GAL4 (PIP5K1 $\beta$ -GAL4BD y PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 456-GAL4BD), y se expresaron en la cepa de levadura Y2HGold. El IB con un anticuerpo anti-PIP5K1 $\beta$  mostró la presencia de dos bandas de 87 kDa y 77 kDa correspondientes a PIP5K1 $\beta$ -GAL4BD y PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 456-GAL4BD respectivamente (Fig. 32A). La expresión del mutante PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 456 afectó al crecimiento de Y2HGold en comparación con PIP5K1 $\beta$ . En medio rico, el tiempo de duplicación de las levaduras que expresaban PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 456 fue de 3,5 horas frente a 2,5 horas de las que expresaban PIP5K1 $\beta$  y el crecimiento en medios mínimos fue escaso (Fig. 32B y C). El fenotipo del mutante se asemeja al descrito para el mutante de la quinasa MSS4 y podría reflejar el papel de PIP5K1 $\beta$  en la reorganización de actina durante la gemación de levaduras y la generación de células hijas “defectuosas” (Desrivieres et al., 1998). Estos resultados muestran el papel relevante de PIP5K1 $\beta$  pero nos impidió utilizar el mutante PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 456 en la búsqueda de nuevas proteínas de interacción.



**Figura 32. Expresión de PIP5K1 $\beta$  y PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 456 en levadura.** (A) IB de extractos de Y2HGold que sobreexpresan PIP5K1 $\beta$  y PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 456 (B) Curva de crecimiento en medio rico YPDA de Y2HGold que sobreexpresan PIP5K1 $\beta$  y PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 456. (C) Crecimiento de colonias de PIP5K1 $\beta$  y PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 456 en medio mínimo sin Triptófano (SD/Trp).

Generamos una genoteca a partir del ADNc de células HL60 diferenciadas a neutrófilos (dHL60) que co-transformamos con el plásmido PGADT7-rec en la cepa de levadura Y187 (Fig. 33A). Obtuvimos una genoteca con  $4 \times 10^6$  clones individuales y una densidad celular de  $1 \times 10^9$  cfu/ml (Fig. 33A). Enfrentamos PIP5KI $\beta$ -GAL4BD con la genoteca y tras una selección en medio restrictivo (DDO/Aba100), obtuvimos 182 colonias, que re-seleccionamos en medios más restrictivos (QDO, QDO/Aba100), obteniendo 44. Seleccionamos 13 clones con inserto aparentemente  $> 400$  pb y tras la secuenciación observamos que 5 contenían los oligonucleótidos empleados en la preparación del ADNc (clones 88, 118, 171, 175 y 182), 5 tenían inserto  $> 100$  pb y  $< 200$  pb (clones 25, 31, 64, 80 y 173) y 3 resultaron tener insertos  $> 400$ pb (clones 12, 123 y 180), la secuencia del 123 y 180 fue idéntica y los insertos del 64 y 80 no se traducen (Tabla 9). Finalmente tuvimos 5 clones (12, 25, 31, 123 y 173) con inserto codificante para fragmentos de proteínas, identificadas con el programa BLAST (Tabla 9).



**Figura 33.** Construcción de la genoteca en la cepa de levaduras Y187 a partir del ADNc de células dHL60 y validación de las posibles interacciones detectadas. (A)

Esquema de la preparación de la genoteca por co-transfección del ADNc y el plásmido PGADT7-rec. (B) Interacción entre PIP5KI $\beta$  y los 5 clones con inserto codificante. Crecimiento de colonias co-

transformadas en medios restrictivos (DDO/A100, DDO/A125 y QDO/X/A100). (C) Validación del sistema para la detección de proteínas de interacción con PIP5KI $\beta$ . Crecimiento de colonias en medios restrictivos de las co-transformaciones con pGBKT7-PIP5KI $\beta$ /pGADT7-EBP50 y pGBKT7-C83/pGADT7-EBP50.

Tabla. 9. Clones seleccionados por interacción con PIP5KI $\beta$ .

Clon	Inserto (pb)	PROTEINA
12	483	Proteína no caracterizada. LOC102724549
25	103	quinasa TAO1
31	108	IQGAP 1 IQGAP 2
64	137	Inserto no Codificante
80	90	Inserto no Codificante
88	Oligonucleótidos	---
118	Oligonucleótidos	---
123	598	Proteína Asociada a Remodelación de Matriz 7 (isof. 1,2,3).
171	Oligonucleótidos	---
173	112	Nucleolar Protein 40 kDa.
175	Oligonucleótidos	---
180	598	Proteína Asociada a Remodelación de Matriz 7 (isof. 1,2,3).
182	Oligonucleótidos	---

El plásmido de los 5 clones que presentaban inserto codificante se cotransformó con el plásmido PGBKT7-PIP5KI $\beta$  para validar la posible interacción. En ningún caso obtuvimos colonias positivas (Fig. 33B). La imposibilidad de detectar interacción podría deberse a la incapacidad del sistema para detectar interacciones de la PIP5KI $\beta$  con otras proteínas en levaduras. Validamos el sistema con la interacción ya descrita del extremo C-terminal de PIP5KI $\beta$  con EBP50 (Lacalle et al., 2007; Mañes et al., 2010). Co-transformamos la cepa

Y2HGold con el plásmido pGBKT7 conteniendo los últimos 83 aminoácidos de PIP5KI $\beta$  (PGBKT7-C83) y pGADT7-EBP50. Se obtuvieron 280, 263 y 208 colonias en los medios DDO/A100, QDO/X y QDO/X/A100, respectivamente. Cuando co-transformamos pGBKT7-PIP5KI $\beta$  y pGADT7-EBP50 no obtuvimos colonias en ninguno de los medios de selección (Fig. 33C). Este resultado nos indica que, en levadura, la PIP5KI $\beta$  completa sufre posiblemente un plegamiento inadecuado. Estos resultados cuestionan la validez del sistema de dobles híbridos para detectar interacciones con PIP5KI $\beta$ .

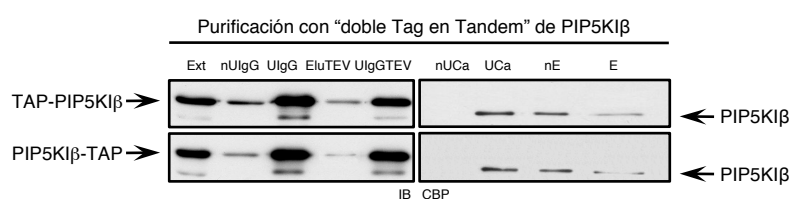
#### 4.3.2. Búsqueda de proteínas de interacción con PIP5KI $\beta$ mediante el sistema de purificación con “doble tag en tandem”.

Como alternativa al sistema de doble híbrido, utilizamos el sistema de purificación con “doble tag en Tandem” (“TAP-Tagging”) (Rigaut et al., 1999; Tsai and Carstens, 2006). En este sistema la proteína de interés se clona como proteína de fusión a dos “tags” y se introduce en células de mamífero. La presencia del doble “tag” permite la purificación secuencial, mediante dos columnas de afinidad, con una alta especificidad.

Empleamos el vector pCAGGS-TAP, que contiene un dominio de Proteína A, repetido dos veces, un sitio de corte para la proteasa del Virus del Mosaico del Tabaco (TEV) y un dominio de la Proteína de Unión a Calmodulina (CBP). Realizamos dos construcciones: TAP-PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\beta$ -TAP. La construcciones se expresaron en células HEK-293T estimuladas o

no con ácido lisofosfatídico (LPA), factor mitogénico que promueve la migración a través de la activación de la vía Rho-Rho quinasa (Harrison et al., 2013). El proceso de purificación se muestra en la Fig. 34.

Las proteínas en la fracción final eluída se identifican por huella peptídica mediante nano-HPLC-ESI-MS/MS usando un espectrómetro de masas de alta resolución Triple-TOF. Utilizamos como motor de búsqueda el programa Mascot v.2.3.02 (Hirosawa et al., 1993) y como base de datos UniProt/SwissProt (humano). Se consideran como identificaciones fiables aquellas con una “tasa de falsos positivos” (FDR) <1% a nivel de péptido y una “puntuación de correlación o similitud” (“score”) del programa Mascot  $\geq 35$ -45.



**Figura 34. Purificación de TAP-PIP5KIβ y PIP5KIβ-TAP.** Análisis de las fracciones del proceso de purificación por IB con anticuerpo anti-CBP. Extracto

(Ext), nUIgG (proteína que no se une a IgG), UIgG (proteína unida a resina IgG), EluTEV (proteína eluída de IgG por corte con TEV), UIgGTEV (proteína unida a resina de IgG tras corte con TEV), nUCa (proteína no unida a resina de Calmodulina), UCa (proteína unida a Calmodulina), nE (proteína unida a resina de Calmodulina después de eluir) y E (proteína eluída).

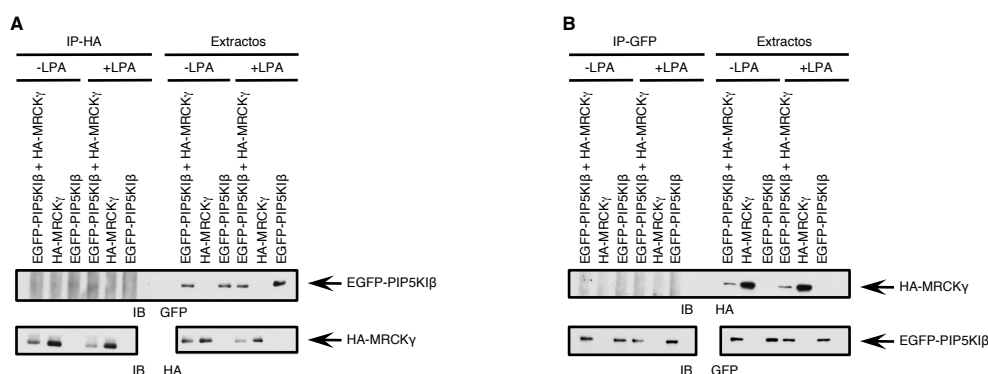
La estimulación con LPA aumentó al doble el número de proteínas que interaccionaban con TAP-PIP5KIβ; sin embargo, detectamos similar número de interactuantes con o sin estímulo para PIP5KIβ-TAP. Este resultado sugiere una menor disponibilidad de PIP5KIβ-TAP a la interacción con otras proteínas. Analizamos todos los posibles interactuantes de TAP-PIP5KIβ y descartamos las proteínas que no guardan relación con los procesos de polarización y migración de leucocitos. El sistema identificó PIP5KIβ con una elevada fidelidad (“score” >1800). Las isoformas PIP5KIα (“score” >200) y PIP5KIγ (“score” >75) se detectaron como posibles interactuantes de TAP-PIP5KIβ. Este resultado sugiere la formación de heterodímeros con α y γ en células HEK-293T. Ezrina, proteína que interacciona con PIP5KIβ en células dHL60 (Lacalle et al., 2007) también se identificó como interactuante de TAP-PIP5KIβ (score 30), solamente tras la estimulación. La proteína “Myosin Light Chain Kinase 2” (MYLK2) (“score” 140) podría interaccionar con Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina (Wilson, 1992), lo que cuestiona su interacción con PIP5KIβ. Las proteínas ASAP2 y MRCKγ fueron identificadas sólo en respuesta a estimulación con LPA y participan en la reorganización del citoesqueleto durante la migración celular. A pesar de que estas proteínas no cumplen estrictamente el criterio de FDR < 1%, tienen buenos “score” de identificación a nivel de péptido (44 para MRCKγ en TAP-PIP5KIβ, y 39 para ASAP2 en PIP5KIβ-TAP). Tanto MRCKγ como ASAP2 presentan un

dominio de homología a pleckstrina (PH) que permitiría su interacción con fosfolípidos como el PIP2 (Hashimoto et al., 2004; Kondo et al., 2000; Ng et al., 2004; Unbekandt and Olson, 2014).

### 4.3.3. Análisis de la interacciones PIP5KI $\beta$ /MRCK $\gamma$ y PIP5KI $\beta$ /ASAP2.

#### 4.3.3.1. PIP5KI $\beta$ /MRCK $\gamma$ .

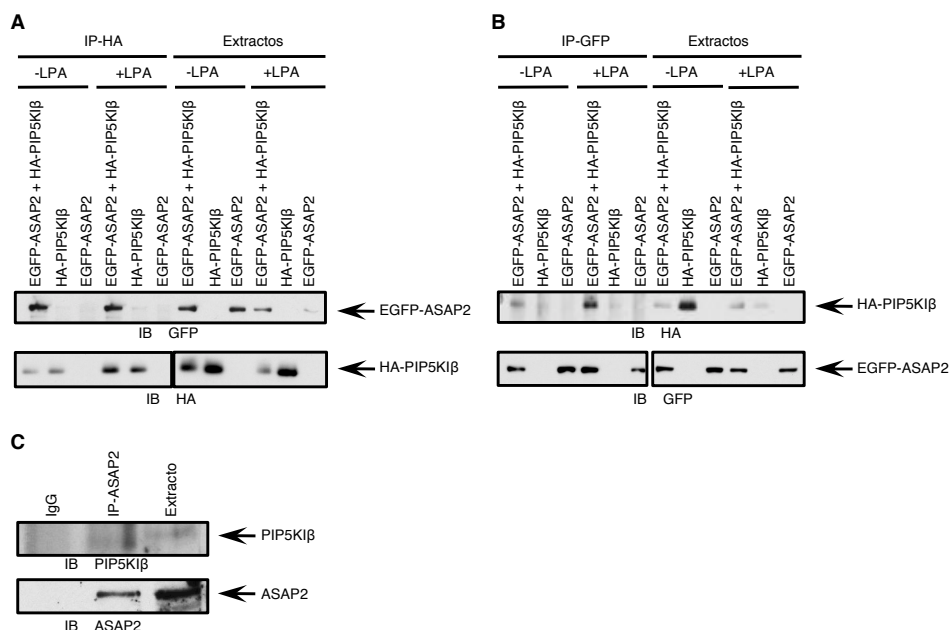
Para validar las interacciones de PIP5KI $\beta$  con MRCK $\gamma$  realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación (co-IP) en células HEK-293T co-transfectadas con HA-MRCK $\gamma$  y EGFP-PIP5KI $\beta$ , estimuladas o no con LPA. Empleamos como control de inmunoprecipitación inespecífica los extractos de los transfectantes simples. No observamos co-inmunoprecipitación entre HA-MRCK $\gamma$  y EGFP-PIP5KI $\beta$ , al inmunoprecipitar con anti-HA ó anti-GFP independientemente de la estimulación con LPA (Fig. 35), por lo que esta interacción no pudo validarse. Los anticuerpos comerciales anti-MRCK $\gamma$  de los que disponíamos no reconocen la proteína endógena ni en IB ni en IP, por lo que no pudimos validar la formación del complejo endógeno MRCK $\gamma$ /PIP5KI $\beta$  en células HEK-293T.



**Figura 35. EGFP-PIP5KI $\beta$  y HA-MRCK $\gamma$  no co-inmunoprecipitan en extractos celulares HEK-293T estimuladas o no con LPA.** Inmunoprecipitación (IP) de extractos de HEK-293T que co-expresan HA-MRCK $\gamma$  y EGFP-PIP5KI $\beta$  con anticuerpos anti-HA (**A**) y anti-GFP (**B**). IB revelados con anti-GFP y anti-HA.

#### 4.3.3.2. PIP5KI $\beta$ /ASAP2.

Para validar la posible interacción de PIP5KI $\beta$  con ASAP2, usamos células HEK-293T que co-expresan EGFP-ASAP2 y HA-PIP5KI $\beta$ . Observamos que EGFP-ASAP2 y HA-PIP5KI $\beta$  co-precipitan en extractos de células HEK-293T, utilizando tanto anticuerpos anti-HA como anti-GFP (Fig. 36A y B). ASAP2 interaccionó con PIP5KI $\beta$  en presencia y ausencia de estímulo, sugiriendo que dicha unión ocurre de forma constitutiva.

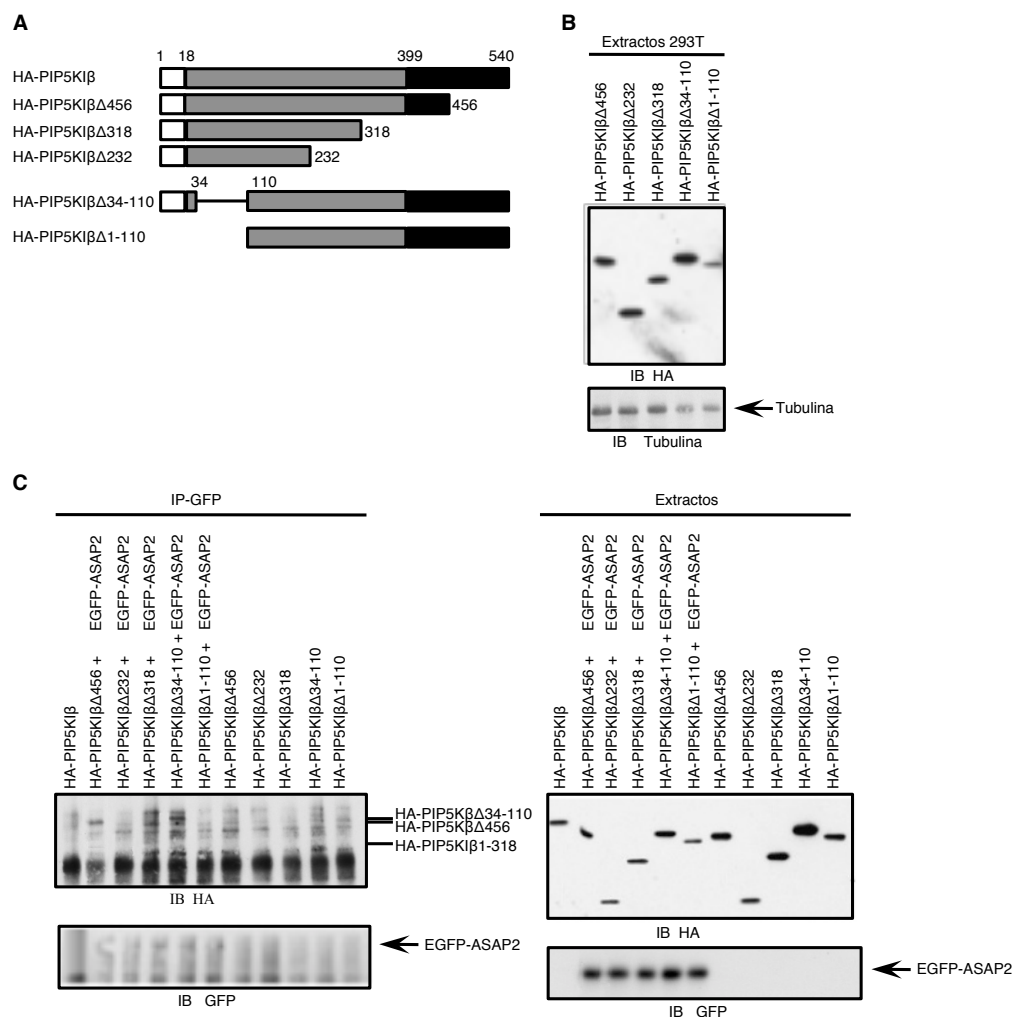


**Figura 36. HA-PIP5KIβ y GFP-ASAP2 co-inmunoprecipitan.** (A) IP con anticuerpo anti-HA de extractos HEK-293T que co-expresan HA-PIP5KIβ y GFP-ASAP2, estimuladas o no con LPA. (B) IP con anticuerpo anti-GFP de los extractos de (A). En ambos casos los IB se revelaron con anti-HA y anti-GFP. Como control de inmunoprecipitación inespecífica se usan extractos de HEK-293T que expresan una de las dos proteínas. (C) Co-IP de PIP5KIβ con ASAP2 endógena en HEK-293T. Cantidades iguales de extractos de HEK-293T estimuladas con LPA se inmunoprecipitaron con anti-ASAP2, los IB se revelaron con anti-PIP5KIβ; se indica el control de inmunoprecipitación inespecífica (IgG).

Analizamos la interacción de las proteínas ASAP2 y PIP5KIβ endógenas en células HEK-293T estimuladas con LPA. La inmunoprecipitación de ASAP2 reveló la presencia de una banda de 65 kDa, correspondiente a PIP5KIβ (Fig. 36C). En conjunto, estos resultados identifican ASAP2 como una nueva proteína de interacción de PIP5KIβ; ASAP2 es una proteína con actividad GAP para las GTPasas de la familia “ADP-Ribosilation Factor” (ARF) (Hashimoto et al., 2004; Uchida et al., 2001) lo cual sugiere una unión funcional entre esta quinasa lipídica y la vía de ARF.

#### 4.3.3.3. Identificación de la región de interacción de PIP5KIβ con ASAP2.

Para determinar la región de PIP5KIβ implicada en la interacción con ASAP2 realizamos experimentos de co-IP con EGFP-ASAP2 y los mutantes HA-PIP5KIβΔ232, HA-PIP5KIβΔ318, HA-PIP5KIβΔ34-110, HA-PIP5KIβΔ1-110 y HA-PIP5KIβΔ456 (Fig. 37A).



**Figura 37. Identificación de la región de PIP5KIβ implicada en la interacción con ASAP2. (A) Esquema de los mutantes de delección de PIP5KIβ. (B) Expresión de los mutantes de delección de HA-PIP5KIβ en HEK-293T. Extractos de HEK-293T transfectadas con cada mutante y estimuladas con LPA. IB anti-HA y anti-tubulina. (C) Inmunoprecipitados, con anti-GFP, de extractos de HEK-293T co-transfectadas con los plásmidos de los mutantes de delección de HA-PIP5KIβ y el EGFP-ASAP2 ó transfectadas solamente con los mutantes, y estimuladas en ambos casos con LPA. Se muestran los IB de las IP anti-GFP, así como de los extractos de HEK-293T empleados en las IP revelados con anti-HA y anti-GFP. Se señala la posición de las bandas de los mutantes co-inmunoprecipitados con EGFP-ASAP2.**

Observamos co-precipitación de EGFP-ASAP2 con los mutantes HA-PIP5KIβΔ34-110, HA-PIP5KIβΔ318 y HA-PIP5KIβΔ456, sugiriendo que la región de PIP5KIβ implicada en la interacción con ASAP2 estaría entre los aminoácidos 110 y 318.



#### 4.4. Estudio funcional de la $\alpha$ y heterodimerización de PIP5KI $\beta$ .

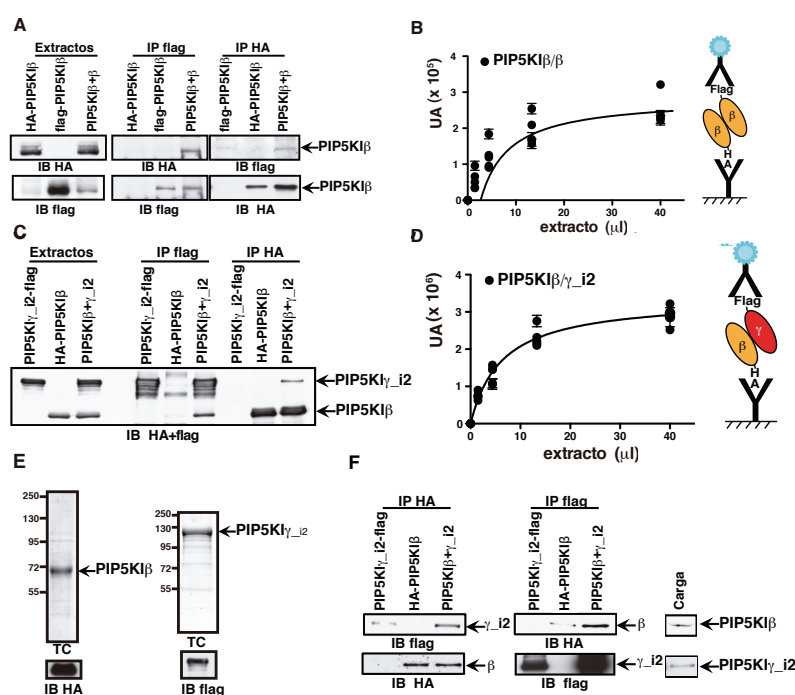
La identificación de PIP5KI $\alpha$  y I $\gamma$  mediante el sistema “Tap-Tagging” como posibles interactuantes de PIP5KI $\beta$  sugirió la formación de heterodímeros  $\beta/\alpha$  y  $\beta/\gamma$  en células HEK-293T. Decidimos estudiar la posibilidad de formación de homo y heterodímeros de PIP5KI $\beta$ .

##### 4.4.1 Homo y heterodimerización de PIP5KI $\beta$ .

Para comprobar si PIP5KI $\beta$  forma dímeros, inmunoprecipitamos extractos de células HEK-293T que sobre-expresaban PIP5KI $\beta$  con dos tags diferentes (HA y flag), con anticuerpos para cada uno de los tags. Los extractos de los transfectantes simples los empleamos como control de inmunoprecipitación inespecífica. En extractos que co-expresan ambas proteínas, la inmunoprecipitación con anti-flag o anti-HA indujo la co-IP de HA-PIP5KI $\beta$  o flag-PIP5KI $\beta$ , respectivamente (Fig. 38A), lo cual sugiere la homodimerización de PIP5KI $\beta$ . También realizamos un ensayo ELISA tipo sándwich (Fig. 38B) consistente en atrapar HA-PIP5KI $\beta$  con un anticuerpo anti-HA y añadir extractos de células que sobreexpresan flag-PIP5KI $\beta$  en la fase soluble; la unión HA-PIP5KI $\beta$ /flag-PIP5KI $\beta$  se detectó mediante un anticuerpo anti-flag. Observamos que flag-PIP5KI $\beta$  se une de manera específica a HA-PIP5KI $\beta$  y su unión es dependiente de la dosis de extracto empleada (Fig. 38B). Estos resultados indican la homodimerización de PIP5KI $\beta$ .

Se llevaron a cabo el mismo tipo de experimentos para estudiar la posible heterodimerización de la PIP5KI $\beta$  y la PIP5KI $\gamma_{i2}$ . HA-PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\gamma_{i2}$ -flag co-inmunoprecipitaron en extractos de células que sobreexpresan ambas isoformas (Fig. 38C), y se

observó un efecto dosis-dependiente en la interacción entre HA-PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\gamma_{i2}$ -flag por el ensayo ELISA sándwich (Fig. 38D), indicando la heterodimerización de estas dos isoformas de PIP5KI.



**Figura 38. PIP5KI $\beta$  homodimeriza y forma heterodímeros con PIP5KI $\gamma_{i2}$ .** (A) IP con anticuerpos anti-HA o anti-flag de extractos de células HEK-293T co-transfectadas con HA-PIP5KI $\beta$  y/o flag-

PIP5KI $\gamma_{i2}$ . (B) Ensayo ELISA sándwich para la interacción de HA-PIP5KI $\beta$  con flag-PIP5KI $\beta$ . (C) IP con anticuerpos anti-HA o anti-flag de extractos de células HEK-293T co-transfectadas con HA-PIP5KI $\beta$  y/o PIP5KI $\gamma_{i2}$ -flag. (D) Ensayo ELISA sándwich para la interacción de HA-PIP5KI $\beta$  con PIP5KI $\gamma_{i2}$ -flag. (E) Western blot de PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\gamma_{i2}$  en extractos de células HEK-293T co-transfectadas con HA-PIP5KI $\beta$  y/o PIP5KI $\gamma_{i2}$ -flag. (F) Western blot de PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\gamma_{i2}$  en extractos de células HEK-293T co-transfectadas con HA-PIP5KI $\beta$  y/o PIP5KI $\gamma_{i2}$ -flag.



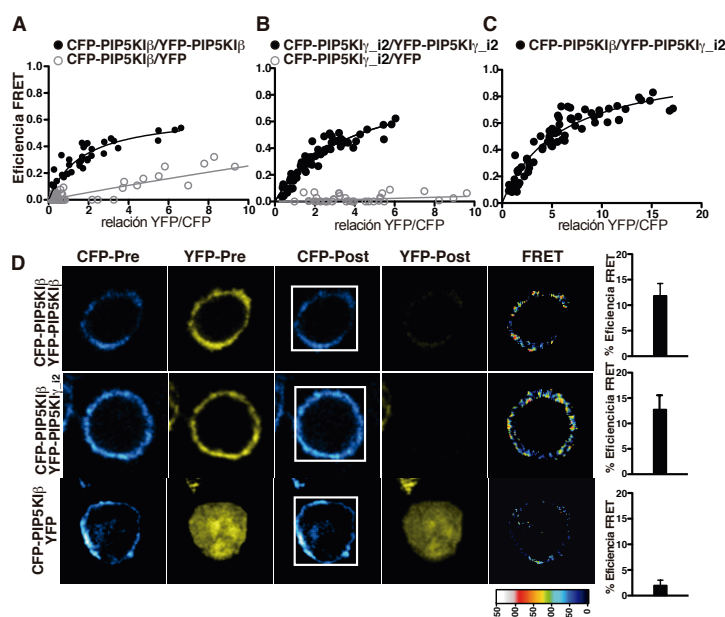
PIP5KI $\beta$ . Las proteínas inmunoprecipitadas se revelaron por IB con anti-HA-HRP y anti-flag-HRP. **(B)** Detección de la homodimerización de PIP5KI $\beta$  mediante ELISA sándwich según esquema. Se representa valores de luminiscencia en UA en función del volumen de extracto [(media (m)  $\pm$  error estándar de la media (ESM)]. **(C)** IP de extractos de HEK-293T transfectadas con HA-PIP5KI $\beta$  y/o PIP5KI $\gamma$ \_i2-flag y procesadas como en (A). **(D)** Detección de la heterodímeros de PIP5KI $\beta$ / $\gamma$ \_i2 mediante ELISA sándwich; los resultados se representan como en (B). **(E)** Pureza de las proteínas purificadas HA-PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\gamma$ \_i2-flag. Estimación por TC. IB con anticuerpos anti-HA y anti-flag confirman la identidad de las mismas. **(F)** IP con anti-HA y anti-flag de la mezcla de ambas proteínas purificadas. Las proteínas inmunoprecipitadas se revelaron por IB con los mismos anticuerpos.

Determinamos si estas isoformas interaccionan de manera directa, para lo cual purificamos HA-PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\gamma$ \_i2-flag, sobre-expresadas en células HEK-293T por cromatografía de afinidad; la pureza de las muestras de HA-PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\gamma$ \_i2-flag fue de 85% y 90%, respectivamente (Fig. 38E). Mezclamos cantidades iguales de ambas proteínas recombinantes e inmunoprecipitamos con los anticuerpos anti-HA y anti-flag; observamos co-inmunoprecipitación en ambos casos (Fig. 38F). Estos resultados nos indican que PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\gamma$ \_i2 interaccionan de manera directa, sin necesidad de otro componente celular.

El hecho de que PIP5KI $\alpha$  y PIP5KI $\gamma$ , se detectaran como interactuantes de TAP-PIP5KI $\beta$ , indica que no solamente las sobreexpresadas, sino también las PIP5KI endógenas son capaces de dimerizar con PIP5KI $\beta$ .

#### 4.4.2. Formación de homo- y heterodímeros de PIP5KI $\beta$ y PIP5KI $\gamma$ \_i2 en células.

Estudiamos la homo y heterodimerización de las PIP5KI en células vivas mediante “Transferencia de Energía de Resonancia de Forster” (FRET). Generamos curvas de saturación de FRET empleando células HEK-293T co-transfectadas con cantidades constantes del dador CFP-PIP5KI $\beta$  o CFP-PIP5KI $\gamma$ \_i2 y cantidades crecientes del aceptor YFP-PIP5KI $\beta$  o YFP-PIP5KI $\gamma$ \_i2. Obtuvimos FRET positivo para los homodímeros de PIP5KI $\beta$  (Fig. 39A) y de PIP5KI $\gamma$ \_i2 (Fig. 39B) así como para los heterodímeros CFP-PIP5KI $\beta$ /YFP-PIP5KI $\gamma$ \_i2 (Fig. 39C). La señal de FRET máxima (FRET<sub>max</sub>) fue diferente en los tres complejos (PIP5KI $\beta$ /PIP5KI $\beta$ ,  $0,648 \pm 0,06$ ; PIP5KI $\gamma$ \_i2/PIP5KI $\gamma$ \_i2,  $0,947 \pm 0,08$ ; PIP5KI $\beta$ /PIP5KI $\gamma$ \_i2,  $1,069 \pm 0,06$ ). Los valores de FRET<sub>50</sub> también difieren entre los complejos (PIP5KI $\beta$ /PIP5KI $\beta$   $1,695 \pm 0,39$ ; PIP5KI $\gamma$ \_i2/PIP5KI $\gamma$ \_i2  $3,656 \pm 0,57$ ; PIP5KI $\beta$ /PIP5KI $\gamma$ \_i2  $5,801 \pm 0,73$ ). En este caso, como los interactuantes son diferentes, no podemos establecer comparaciones entre un complejo y otro. No hubo FRET usando las mezclas PIP5KI $\beta$ -CFP/YFP o PIP5KI $\gamma$ \_i2-CFP/YFP (Fig. 39A y B), o mezclas de estas quinasas y VCAM1-YFP, que se localiza en membrana (no mostrado), lo cual indica que la dimerización entre las quinasas es específica.



**Figura 39. Homo y heterodimerización de PIP5KIβ en células vivas.** Análisis de FRET de homodímeros de PIP5KIβ (A), de PIP5KIγ\_i2 (B), y heterodímeros CFP-PIP5KIβ/YFP-PIP5KIγ\_i2 (C). Curvas de saturación de FRET obtenidas en células HEK-293T co-transfectadas con cantidades constantes de CFP-proteína y crecientes de YFP-proteína. Control negativo de FRET: CFP-PIP5KIβ/YFP (A) y CFP-PIP5KIγ\_i2/YFP (B). (D) Análisis de FRET por “photobleaching del

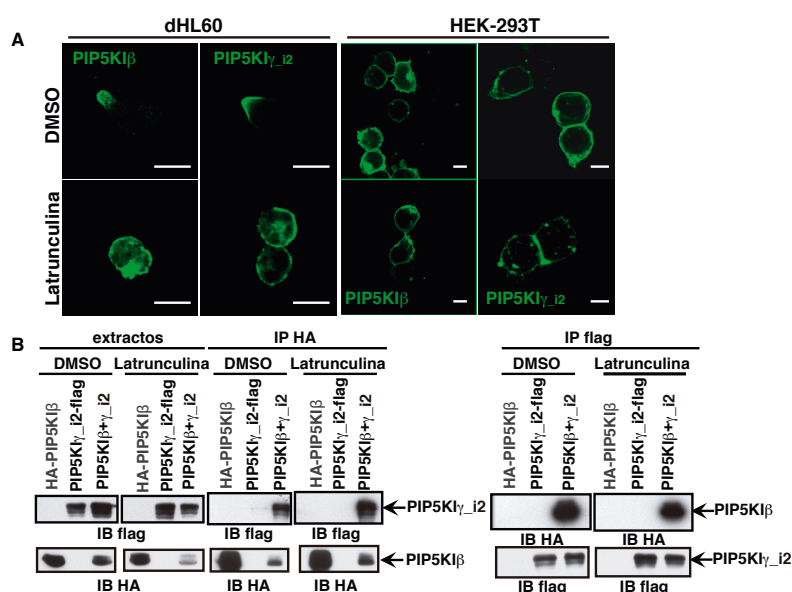
aceptor” de los homo y heterodímeros PIP5KIβ/β y PIP5KIβ/γ\_i2 en células dHL60. Imágenes representativas antes (CFP-Pre, YFP-Pre) y después (CFP-Post, YFP-Post) del “photobleaching” e imágenes de FRET con escala en falso color. Las regiones sometidas a “photobleaching” se remarcan en blanco. PIP5KIβ/YFP se usó como control negativo. Se muestra el % de eficiencia de FRET ( $m \pm \text{ESM}$ ).

Empleamos la extinción de la fluorescencia del fluorocromo aceptor (“photobleaching del aceptor”) para estudiar la localización de los homo y heterodímeros de PIP5KIβ en células dHL60 y confirmar los datos obtenidos de las curvas de saturación de FRET. Transfectamos células dHL60 con CFP-PIP5KIβ/YFP-PIP5KIβ o CFP-PIP5KIβ/YFP-PIP5KIγ\_i2. Todas las determinaciones de FRET se realizaron con células que expresaban YFP/CFP en proporción 4:1. Las proteínas de fusión se localizaron en la superficie celular y detectamos FRET para los homo y heterodímeros de PIP5KIβ con valores de eficiencia similares (Fig. 39D). No observamos transferencia de energía en el control CFP-PIP5KIβ/YFP (Fig. 39D). PIP5KIβ y PIP5KIγ\_i2 co-localizan en el urópodo de células dHL60 polarizadas (Lacalle et al., 2007; Mañes et al., 2010); no pudimos determinar si los heterodímeros PIP5KIβ/γ\_i2 se forman preferentemente en el urópodo ya que las medidas de FRET no eran precisas, bien por el bajo número de píxeles en esta región o por la saturación de la fluorescencia debido a acumulación de proteína. Estos resultados indican que PIP5KIβ y PIP5KIγ\_i2 forman homo y heterodímeros en la membrana plasmática de las células dHL60.

#### 4.4.3. Efecto de la polimerización de actina en la formación de dímeros β/γ.

Decidimos estudiar el papel del citoesqueleto de actina en la homo y heterodimerización de las PIP5KI. El tratamiento de células dHL60 o HEK-293T con latrunculina B (inhibidor de la polimerización de actina) no tuvo efecto sobre la asociación de PIP5KIβ o PIP5KIγ\_i2 a la membrana plasmática (Fig. 40A). Sin embargo, latrunculina inhibió la formación del urópodo,

la acumulación de las quinasas (Lacalle et al., 2007; Lokuta et al., 2007) y la polarización de las células dHL60 inducida por  $\beta$ MLP. Así mismo, apreciamos bandas de co-IP tanto con el anticuerpo anti-HA como con el anti-flag, solamente en extractos de células que co-expresan HA-PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\gamma$ \_i2-flag (Fig. 40B), lo que sugiere que la heterodimerización es intrínseca a estas quinasas y no depende de la agregación inducida por la reorganización del citoesqueleto actina.



**Figura 40. Efecto de latrunculina B en la localización celular y la dimerización de PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\gamma$ \_i2.** (A) Localización de EGFP-PIP5KI $\beta$  y EGFP-PIP5KI $\gamma$ \_i2 por microscopía confocal en células dHL60 y HEK-293T tratadas con latrunculina B (10 $\mu$ M, 30min) y estimuladas (dHL60) con 100nM  $\beta$ MLP. Barra, 10 $\mu$ m.

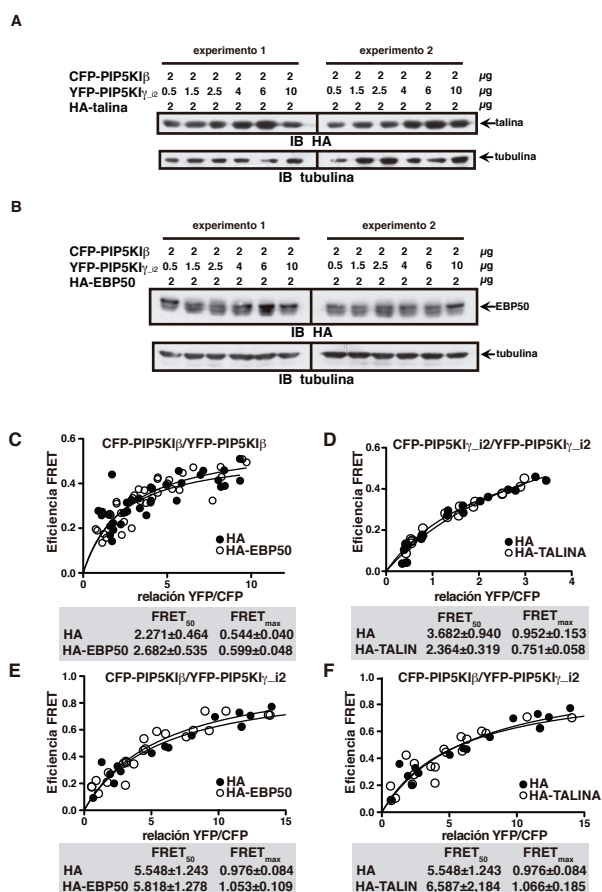
(B) IP con anti-HA y anti-flag de extractos de células HEK-293T, que sobreexpresan HA-

PIP5KI $\beta$  y/o flag-PIP5KI $\gamma$ \_i2 tratadas con DMSO o latrunculina B (10  $\mu$ M, 30 min). Las proteínas inmunoprecipitadas se revelaron en IB con anti-HA-HRP y anti-flag-HRP.

#### 4.4.4. Modulación de la dimerización de PIP5KI $\beta$ y PIP5KI $\gamma$ \_i2 por EBP50 y Talina.

En la región C-terminal de PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\gamma$ \_i2 se localizan los motivos de interacción con EBP50 (Lacalle et al., 2007; Mañes et al., 2010) y con Talina (de Pereda et al., 2005; Di Paolo et al., 2002; Ling et al., 2002), respectivamente. Decidimos estudiar si la expresión de EBP50 o Talina modulan la formación de los heterodímeros PIP5KI $\beta$ / $\gamma$ \_i2. La eficiencia de FRET depende de la orientación relativa y la distancia entre los pares de proteínas fluorescentes. Como resultado de su interacción con EBP50 o Talina, la disponibilidad para la interacción o la afinidad de estas isoformas de PIP5KI podría alterarse, lo cual podría provocar cambios en la señal de FRET.

Transfectamos células HEK-293T con HA, HA-EBP50 o HA-Talina, y con cantidades constantes del ADN de la proteína dadora (CFP-PIP5KI $\beta$  o CFP-PIP5KI $\gamma$ \_i2) y cantidades crecientes de la aceptora (YFP-PIP5KI $\beta$  o YFP-PIP5KI $\gamma$ \_i2). La sobreexpresión de HA-EBP50 y HA-Talina fue constante y no provocó variación en la fluorescencia dadora/aceptora (Fig. 41A y B; tabla 10).



**Figura 41. EBP50 y Talina no alteran la formación de los homo y heterodímeros PIP5KIβ/β y PIP5KIβ/γ<sub>i2</sub>.** (A) Sobreexpresión de HA-Talina y (B) HA-EBP50 en células HEK-293T co-transfectadas con CFP-PIP5KIβ/YFP-PIP5KIγ<sub>i2</sub>. Se indica la cantidad de los tres plásmidos empleados (μg). Los niveles de proteína sobreexpresada se analizaron mediante IB con anticuerpo anti-HA. Los filtros se revelaron con anti-tubulina para normalizar la cantidad de proteína cargada. En cada caso se muestran dos experimentos independientes. Curvas de saturación de FRET empleando células HEK-293T co-transfectadas con (C) CFP-PIP5KIβ, YFP-PIP5KIβ y HA (control) o HA-EBP50, (D) CFP-PIP5KIγ<sub>i2</sub>, YFP-PIP5KIγ<sub>i2</sub> y HA (control) o HA-Talina, (E) CFP-PIP5KIβ, YFP-PIP5KIγ<sub>i2</sub> y HA o HA-EBP50, (F) CFP-PIP5KIβ, YFP-PIP5KIγ<sub>i2</sub> y HA o HA-Talina. Se muestran los valores de FRET<sub>max</sub> y FRET<sub>50</sub> (m ± ESM; n=5).

**Tabla 10. Fluorescencia de las proteínas dadoras CFP-PIP5KI (β o γ<sub>i2</sub>) y aceptoras YFP-PIP5KI (β o γ<sub>i2</sub>) en células co-transfectadas con HA, HA-EBP50 o HA-Talina**

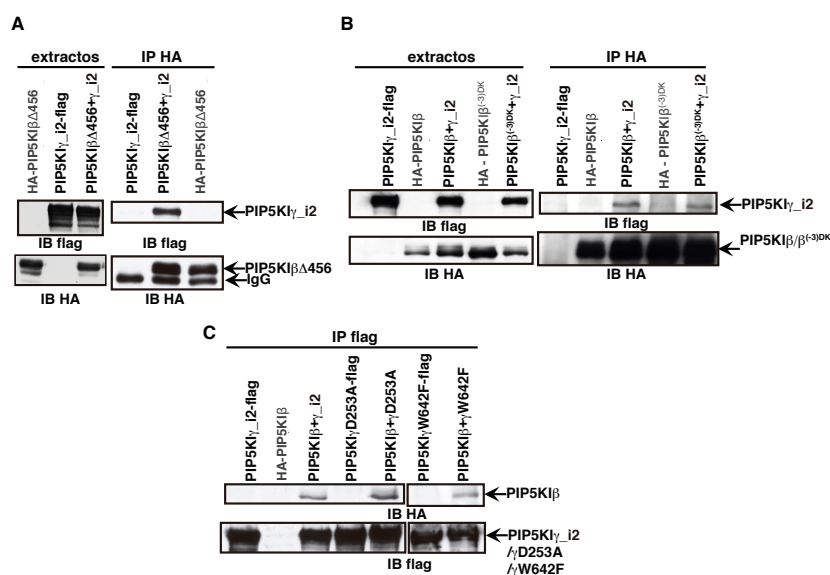
Plásmidos	CFP-PIP5KIβ (2 μg) UF	YFP-PIP5KIβ UF
CFP-PIP5KIβ/ YFP-PIP5KIβ +HA	150,038±63,264	~200,000-1,200,000
CFP-PIP5KIβ/ YFP-PIP5KIβ +HA-EBP50	216,540±84,447	~200,000-1,200,000
	<b>CFP-PIP5KIγ<sub>i2</sub> (2 μg)UF</b>	<b>YFP-PIP5KIγ<sub>i2</sub> UF</b>
CFP-PIP5KIγ <sub>i2</sub> / YFP-PIP5KIγ <sub>i2</sub> +HA	213,098±86,879	~160,000-1,500,000
CFP-PIP5KIγ <sub>i2</sub> / YFP-PIP5KIγ <sub>i2</sub> +HA-Talina	285,837±126,931	~220,000-1,400,000
	<b>CFP-PIP5KIβ (2 μg) UF</b>	<b>YFP-PIP5KIγ<sub>i2</sub> UF</b>
CFP-PIP5KIβ/ YFP-PIP5KIγ <sub>i2</sub> +HA	112,218±68,714	~100,000-1,400,000
CFP-PIP5KIβ/ YFP-PIP5KIγ <sub>i2</sub> +HA-EBP50	146,207±77,498	~100,000-1,500,000
CFP-PIP5KIβ/ YFP-PIP5KIγ <sub>i2</sub> +HA-Talina	117,025±61,774	~90,000-1,500,000

UF: Unidades de Fluorescencia (m ± ESM).

Los valores de FRET<sub>50</sub> y FRET<sub>max</sub> para los homodímeros PIP5KIβ/β y PIP5KIγ<sub>i2</sub>/γ<sub>i2</sub> así como para los heterodímeros PIP5KIβ/γ<sub>i2</sub> no fueron alterados significativamente por la expresión de EBP50 o Talina (Fig. 41C-F). Estos resultados indican que la sobreexpresión de

estas proteínas no altera la afinidad aparente o el número de complejos entre PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\gamma$ \_i2.

Empleamos la inmunoprecipitación para estudiar más en detalle el papel de la región C-terminal en la heterodimerización de PIP5KI $\beta$ / $\gamma$ \_i2. Para ello co-expresamos PIP5KI $\gamma$ \_i2-flag con HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 456, o HA-PIP5KI $\beta$ <sup>(-3)D/K</sup>, que no se une a dominios PDZ (Mañes et al., 2010). PIP5KI $\gamma$  co-inmunoprecipitó con HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 456 (Fig. 42A) y con HA-PIP5KI $\beta$ <sup>(-3)D/K</sup> (Fig. 42B) indicando que la región C-terminal de PIP5KI $\beta$  no está implicada en la formación del heterodímero PIP5KI $\beta$ / $\gamma$ \_i2.



**Figura 42.** La dimerización es independiente de la región C-terminal de las PIP5KI $\beta$ . IP con anticuerpo anti-HA de extractos de HEK-293T que expresan, (A) PIP5KI $\gamma$ \_i2-flag sola o en co-expresión con HA-PIP5KI $\beta$  o HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 456 y (B) PIP5KI $\gamma$ \_i2-flag sola o en

co-expresión con HA-PIP5KI $\beta$  o HA-PIP5KI $\beta$ <sup>(-3)D/K</sup>. Las proteínas inmunoprecipitadas en (A) y (B) se revelaron en IB con anti-HA y anti-flag. (C) IP con anticuerpo anti-flag de extractos de HEK-293T que expresan los mutantes PIP5KI $\gamma$ D253A-flag y PIP5KI $\gamma$ W642F-flag solos o en co-expresión con HA-PIP5KI $\beta$ . Los inmunoprecipitados se revelaron en IB con anti-HA y anti-flag.

Experimentos de co-IP de PIP5KI $\beta$  con el mutante catalíticamente inactivo de PIP5KI $\gamma$ \_i2 (PIP5KI $\gamma$ D253A) o el mutante de esta quinasa que no une Talina (PIP5KI $\gamma$ W642F) mostraron que las proteínas co-inmunoprecipitan en ambos casos (Fig. 42C), lo que confirmó que la heterodimerización es independiente de la unión a Talina o la actividad de la PIP5KI $\gamma$ .

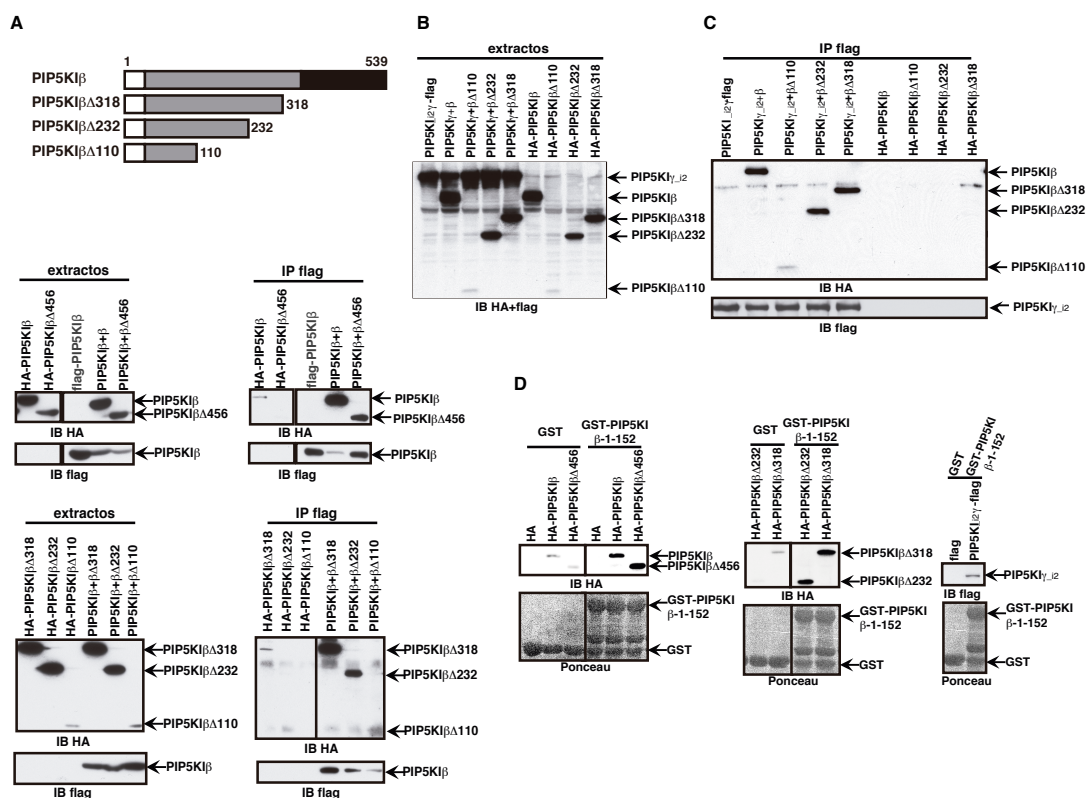
En conjunto estos resultados indican que la dimerización no está regulada por proteínas que interaccionan con el C-terminal de las PIP5KI y reafirman la idea de que es una característica intrínseca de estas proteínas.

#### 4.4.5. Identificación de la región de dimerización de PIP5KI $\beta$ .

Con vistas a identificar el posible dominio de dimerización de PIP5KI $\beta$ , utilizamos algunos de los mutantes de delección de PIP5KI $\beta$  de los que disponíamos así como el mutante HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 110 (Fig. 43A). Realizamos experimentos de co-IP para analizar la formación de

homo y heterodímeros en células HEK-293T co-transfectadas con flag-PIP5KI $\beta$  o PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub>-flag y los mutantes de HA-PIP5KI $\beta$  respectivamente. Encontramos que flag-PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub>-flag interaccionan con los mutantes HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 110, HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 232 y HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 318 (Fig. 43B y C).

Realizamos de forma complementaria, experimentos de “pulldown”. Al fusionar GST al mutante PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 110, la proteína de fusión (GST-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 110) es insoluble en *E. coli*. Por esta razón generamos el mutante GST-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 152 que empleamos como cebo para detectar interacción con extractos de HEK-293T que expresaban los mutantes de delección de HA-PIP5KI $\beta$ . Los ensayos mostraron que GST-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 152 interacciona con HA-PIP5KI $\beta$ , PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub>-flag y con los mutantes HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 232, HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 318 y HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 456 (Fig. 43D). Estos resultados sugieren que la información estructural suficiente para la homo y heterodimerización de PIP5KI $\beta$  se localiza en los primeros 110 aminoácidos de la región N-terminal de PIP5KI $\beta$ .

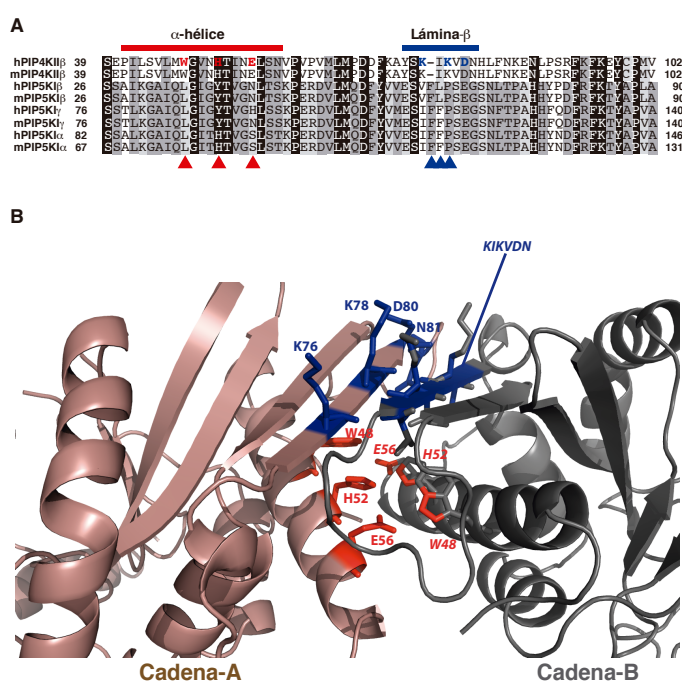


**Figura 43. La región N-terminal de PIP5KI $\beta$  es suficiente para la dimerización.** (A) Esquema de la proteína HA-PIP5KI $\beta$  y los mutantes HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 318, HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 232 y HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 110. (B, C) Co-IP con anti-flag de extractos celulares que co-expresan PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub>-flag (B) o flag-PIP5KI $\beta$  (C) y los mutantes de delección de HA-PIP5KI $\beta$ . La proteínas inmunoprecipitadas se revelaron en IB secuencialmente con anti-HA y anti-flag. (D) Ensayos de “pulldown” con GST, GST-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 152 y extractos de HEK-293T transfectedas con pcDNA3-HA, HA-PIP5KI $\beta$ , HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 232, HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 318, HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 456 y PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub>-flag. Las proteínas interactuantes se revelaron en IB con anti-HA-HRP o anti-flag-HRP. Tinción con rojo Ponceau de la carga de GST-proteínas.



#### 4.4.6. Identificación de los residuos de la región N-terminal claves en la dimerización de PIP5KI $\beta$ .

La dimerización de las PIP4KII tiene lugar a través de una interfase de  $\alpha$ -hélices y hebras- $\beta$  en forma de cierre en la región N-terminal de estas proteínas (Burden et al., 1999; Rao et al., 1998). El alineamiento múltiple de la secuencia N-terminal de las PIP4KII $\beta$  y las tres isoformas de PIP5KI humanas y murinas muestra que la región predicha como  $\alpha$ -hélice se encuentra conservada en las PIP5KI, no así la lámina- $\beta$  (Fig. 44A). El análisis estructural de PIP4KII $\beta$  muestra que la interacción entre las láminas- $\beta$  de cada cadena del dímero es muy fuerte, ya que la mayoría de los residuos que interaccionan con la otra molécula lo hacen a una distancia menor de 4Å; las interacciones entre las  $\alpha$ -hélices involucran residuos voluminosos con carga positiva (Fig. 44B). El análisis de los modelos (<http://www.proteinmodelportal.org>) obtenidos para las tres isoformas de PIP5KI $\beta$  a partir de la estructura de PIP4KII $\beta$ , muestra que se conserva la  $\alpha$ -hélice en las PIP5KI y PIP4KII $\beta$ ; por el contrario la lámina- $\beta$  implicada en la dimerización de PIP4KII $\beta$  no estaría presente en PIP5KI $\beta$ . Sin embargo, la ausencia de la lámina- $\beta$  en este análisis no implica que no haya dimerización, ya que ésta podría formarse después de la interacción de las regiones N-terminales. De hecho, las PIP5KI presentan una

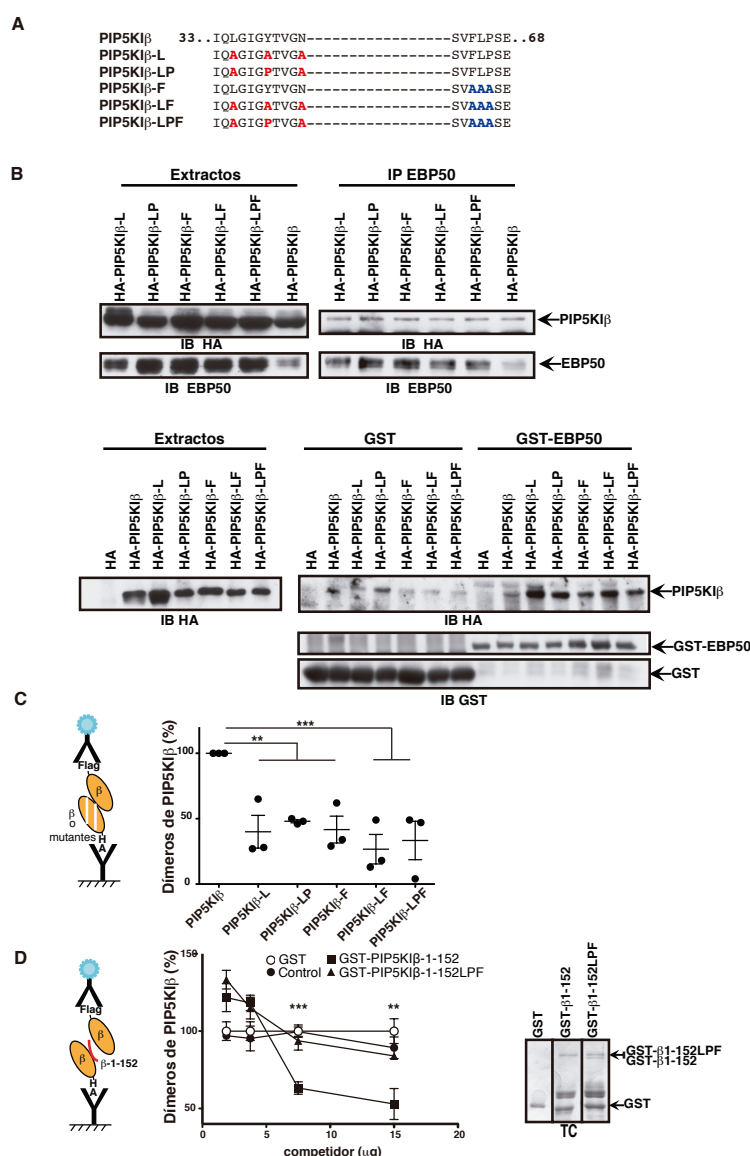


secuencia de aminoácidos aromáticos (F-L/F-P) en esta región que podrían “empaquetarse” tras la dimerización (Fig. 44A).

**Figura 44. Estructura de la región N-terminal de las PIP4KII $\beta$  y PIP5KI humanas.** (A) Alineamiento múltiple de secuencias de la región N-terminal de las PIP4KII $\beta$  y PIP5KI $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , humanas y murinas. El fondo en negro indica residuos altamente conservados y en gris parcialmente conservados. En hPIP4KII se marcan las  $\alpha$ -hélice (rojo) y las lámina- $\beta$  (azul). Los triángulos

indican los residuos mutados en PIP5KI $\beta$ . (B) Estructura de la región de interacción de los dímeros de hPIP4KII $\beta$ . Los residuos implicados en la interacción de las  $\alpha$ -hélices se muestran en rojo y en las interacciones de las láminas- $\beta$  en azul. Las interacciones se consideraron a 4 Å.

Para analizar funcionalmente la implicación de estos motivos en la dimerización de PIP5KI $\beta$  mutamos L35, Y39 y N43, residuos claves en la formación de la  $\alpha$ -hélice así como F64, L65 y P66 que estarían implicados en la conformación en lámina- $\beta$ ; reemplazamos todos estos residuos por alanina (A) a fin de evitar los contactos laterales entre las hélices o eliminar el empaquetamiento de los residuos aromáticos. Nombramos los triples mutantes PIP5KI $\beta$ -L (L35A/Y39A/N43A), PIP5KI $\beta$ -F (F64A/L65A/P66A) y el mutante séxtuple PIP5KI $\beta$ -LF (L35A/Y39A/N43A/F64A/L65A/P66A) (Fig. 45A). Generamos además los mutantes equivalentes en los que Y39 se reemplazó por P39 para impedir completamente la formación de la  $\alpha$ -hélice: PIP5KI $\beta$ -LP (L35A/Y39P/N43A) y PIP5KI $\beta$ -LPF (L35A/Y39P/N43A/F64A/L65A/P66A) (Fig. 45A). Los



**Figura 45. Identificación de residuos claves en la dimerización de PIP5KI $\beta$ .** (A) Secuencia de los mutantes N-terminales de PIP5KI $\beta$ : PIP5KI $\beta$ -L, PIP5KI $\beta$ -LP, PIP5KI $\beta$ -F, PIP5KI $\beta$ -LF y PIP5KI $\beta$ -LPF. Los

residuos mutados se destacan en negrita ( $\alpha$ -hélice en rojo y lámina- $\beta$  en azul). (B) Superior: IP con anti-EBP50 de extractos de HEK-293T que sobreexpresan los

mutantes de HA-PIP5KI $\beta$ . Los inmunoprecipitados se revelaron en IB con anti-HA y anti-EBP50. Inferior: “Pulldowns” con GST, GST-EBP50 y los mutantes de (A) sobreexpresados en HEK-293T. El IB se reveló con anti-HA y anti-GST. (C) Dimerización de los mutantes N-terminales de PIP5KI $\beta$  determinada por ELISA sándwich según esquema y representada como % de dimerización ( $m \pm ESM$ ;  $n=3$ ). t-Student; \*\*\*  $p<0.001$ , \*\*  $p<0.01$ ;



100%=luminiscencia del dímero flag-PIP5KI $\beta$ /HA-PIP5KI $\beta$ . (D) Influencia de la mutación PIP5KI $\beta$ -LPF en la dimerización de PIP5KI $\beta$  determinada por ELISA competitivo según esquema. Se muestra % de dimerización ( $m \pm$  ESM) vs cantidad de cada competidor. 100%=luminiscencia de flag-PIP5KI $\beta$ /HA-PIP5KI $\beta$  sin competidor. TC de las proteínas GST, GST-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 152 y GST-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 152LPF purificadas mediante cromatografía de afinidad y empleadas en ELISA competitivo.

Para estudiar la capacidad de estos mutantes de formar dímeros con PIP5KI $\beta$ , realizamos un ELISA sándwich en el cual, extractos de los mutantes HA se incubaron en la placa recubierta con un anticuerpo anti-HA; añadimos extractos celulares de flag-PIP5KI $\beta$  y detectamos la formación de dímeros con un anticuerpo anti-flag. Utilizamos HA-PIP5KI $\beta$  unido a la fase sólida como control positivo de la dimerización. Todos los mutantes mostraron una disminución significativa de la unión a PIP5KI $\beta$  comparados con la PIP5KI $\beta$  nativa (Fig. 45C) lo cual sugiere que la  $\alpha$ -hélice y la posible lámina- $\beta$  son necesarias para la dimerización. No apreciamos grandes diferencias en la unión a PIP5KI $\beta$  entre los mutantes; esto indica que la destrucción de una u otra estructura en la región N-terminal de PIP5KI $\beta$  es suficiente para impedir la dimerización.

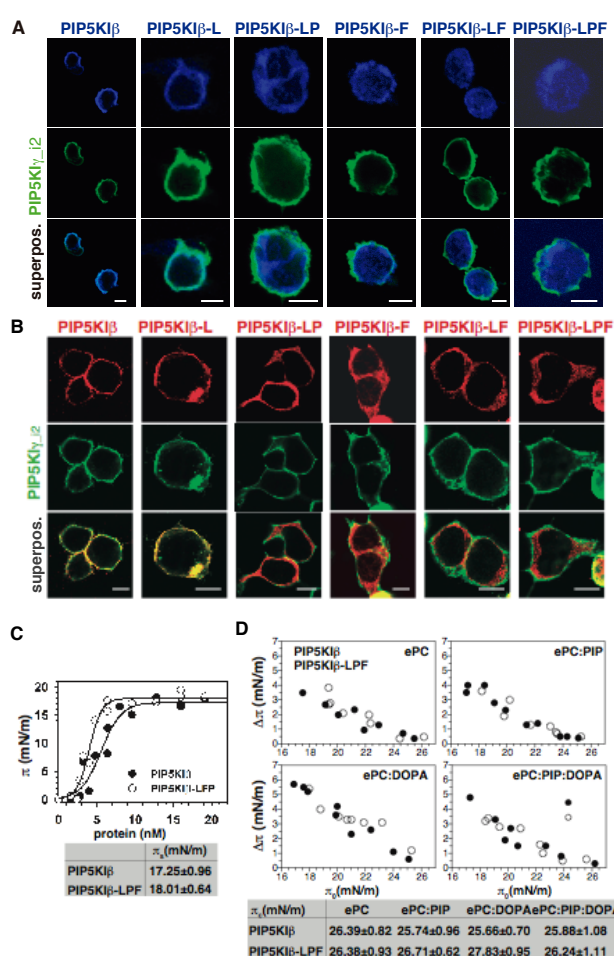
Con el fin de confirmar la importancia de la región N-terminal en la formación de dímeros, diseñamos un ensayo ELISA competitivo en el que analizamos si la proteína con la mutación LPF, que presenta cambios en la  $\alpha$ -hélice y la lámina- $\beta$ , compite o no por la unión con la proteína silvestre. Así, extractos celulares que expresan HA-PIP5KI $\beta$  se preincubaron con cantidades variables de las proteínas purificadas GST-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 152 o GST-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 152LPF, antes de su adición a la placa recubierta con anti-HA. Posteriormente se añadió extractos celulares flag-PIP5KI $\beta$  y la unión se determinó con un anticuerpo anti-flag. Empleamos GST como control. GST-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 152, pero no GST-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 152LPF, fue capaz de competir, de forma dosis-dependiente, con flag-PIP5KI $\beta$  en la formación de dímeros HA-PIP5KI $\beta$ /flag-PIP5KI $\beta$  (Fig. 45D). Este resultado sugiere que el mutante PIP5KI $\beta$ 1-152LPF pierde la capacidad de interactuar con HA-PIP5KI $\beta$  y por tanto de competir por la unión a flag-PIP5KI $\beta$ .

En conjunto estos resultados indican que los residuos claves en la formación de la  $\alpha$ -hélice (L35, Y39 y N43) así como los implicados en la formación de la posible lámina- $\beta$  (F64, L65 y P66) en la región N-terminal, juegan un papel muy importante en la dimerización de PIP5KI $\beta$ .

#### 4.4.7. Efectos de la dimerización en la localización subcelular de PIP5KI $\beta$ .

Decidimos estudiar, mediante inmunofluorescencia, la localización subcelular de los mutantes PIP5KI $\beta$ -L, PIP5KI $\beta$ -F, PIP5KI $\beta$ -LF, PIP5KI $\beta$ -LP y PIP5KI $\beta$ -LPF en células dHL60. Se ha descrito que al sobre-expresar las PIP5KI se localizan en la membrana plasmática (van

den Bout and Divecha, 2009); por ello usamos PIP5KI $\gamma$ \_i2 sobreexpresada como marcador de esta estructura. HA-PIP5KI $\beta$  y el mutante HA-PIP5KI $\beta$ -L ( $\alpha$ -hélice) co-localizan con PIP5KI $\gamma$ \_i2 en la membrana plasmática (Fig. 46A). El mutante PIP5KI $\beta$ -LP, en el cual la sustitución Y39P debe provocar una torsión en la  $\alpha$ -hélice, se localiza fundamentalmente en el citosol. La alteración de la lámina- $\beta$  (HA-PIP5KI $\beta$ -F) o la combinación de mutaciones en la  $\alpha$ -hélice y la lámina- $\beta$  (mutantes HA-PIP5KI $\beta$ -LF y HA-PIP5KI $\beta$ -LPF) también provocó la localización de la quinasa en el citosol (Fig. 46A). Resultados similares se obtuvieron al expresar los mutantes en células HEK-293T (Fig. 46B) y sugieren que las mutaciones en la región de dimerización determinan la localización subcelular de la PIP5KI $\beta$ .



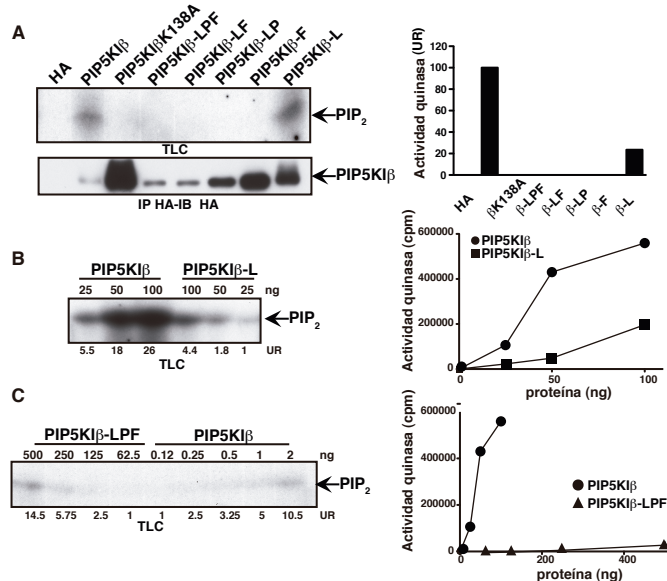
**Figura 46. El dominio de dimerización controla la localización subcelular de PIP5KI $\beta$  pero no su unión a monocapas lipídicas.** Localización de los mutantes N-terminales de HA-PIP5KI $\beta$  en células dHL60 (A) y HEK293T (B). Los mutantes N-terminales de HA-PIP5KI $\beta$  se marcaron con anticuerpos anti-HA y anti-IgG-Cy5 (azul) (A) o -Cy3 (rojo) (B). EGFP-PIP5KI $\gamma$ \_i2 se localiza en verde en ambos paneles. Las imágenes muestran, en cada caso, los canales azul (A), rojo (B), verde (A y B) y la superposición; son representativas de 30 células para cada mutante, n=3. Barra, 10  $\mu$ m. (C) Propiedades surfactantes de PIP5KI $\beta$  y el mutante PIP5KI $\beta$ -LPF en la interfase aire-agua. La gráfica muestra el cambio en la presión lateral en función de la concentración de proteína. En cada caso se muestran los valores de presión de saturación ( $\pi_s$  mN/m) ( $m \pm$  ESM; n=3). (D) Cambios en la presión superficial de las monocapas lipídicas, por la inserción de PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\beta$ -LPF, en función de la presión superficial inicial. Se muestran los valores de

Ya que las mutaciones en la región N-terminal deslocalizan la PIP5KI $\beta$  de la membrana, nos propusimos analizar si la interacción de la quinasa con lípidos de la membrana plasmática estaba alterada. Utilizamos las medidas de presión superficial en una balanza de Langmuir para comparar la interacción de las proteínas purificadas PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\beta$ -LPF con monocapas lipídicas. Analizamos en primer lugar las propiedades surfactantes de las dos proteínas. Tanto la

proteína nativa como el mutante se insertan en la interfase aire-agua, con valores de presión y concentración de saturación de 17,25 y 18,01 mN/m y 12,5 y 9 nM para PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\beta$ -LPF, respectivamente (Fig. 46C). Las escasas diferencias en los valores entre el mutante y la proteína nativa sugieren que las propiedades surfactantes no se afectan con las mutaciones. Determinamos además la concentración de proteína saturante para trabajar en los ensayos de unión a monocapa. Para estudiar el efecto de las mutaciones en la interacción de la PIP5KI $\beta$  con lípidos empleamos monocapas de fosfatidilcolina (ePC), PI4P (sustrato de PIP5KI $\beta$ ) y dioleil ácido fosfático (DOPA), un activador de la PIP5KI $\beta$ . Utilizamos 4 monocapas, ePC, ePC:PI4P (95:5), ePC:DOPA (95:5) y ePC:PI4P:DOPA (90:5:5); inyectamos las proteínas PIP5KI $\beta$  y PIP5KI $\beta$ -LPF a 19,11 nM y 15,94 nM, respectivamente. Los cambios en la presión lateral mostraron que ambas proteínas se insertan igual en todas las monocapas con valores de presión crítica  $\sim 26$  mN/m (Fig. 46D). Este resultado indica que PIP5KI $\beta$  y el mutante poseen propiedades tensoactivas semejantes. Por tanto la mutación LPF, aparentemente, no afecta la capacidad intrínseca de la PIP5KI $\beta$  de interactuar con monocapas lipídicas o, probablemente, con membranas de pequeña curvatura.

#### 4.4.8 Efecto de la dimerización sobre la actividad quinasa de PIP5KI $\beta$ .

Para determinar si las mutaciones en el motivo de dimerización de PIP5KI $\beta$  afectan la actividad de la enzima, medimos la actividad quinasa de inmunoprecipitados de células HEK-293T que sobreexpresan los mutantes PIP5KI $\beta$ -L, PIP5KI $\beta$ -F, PIP5KI $\beta$ -LP, PIP5KI $\beta$ -LF o PIP5KI $\beta$ -LPF. Solamente la enzima nativa y el mutante PIP5KI $\beta$ -L generaron el producto de la reacción de fosforilación de PI4P, el PIP<sub>2</sub> (Fig. 47A). Empleamos el mutante catalíticamente inactivo PIP5KI $\beta$ <sup>K138A</sup> como control negativo del ensayo quinasa.



**Figura 47. El dominio de dimerización controla la actividad quinasa de PIP5KI $\beta$ .** (A) Actividad quinasa *in vitro* de los mutantes N-terminales de HA-PIP5KI $\beta$  inmunoprecipitados de células HEK-293T, empleando PI4P como sustrato y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP radioactivo. TLC del producto de la actividad de cada mutante y su densitometría en unidades relativas (UR). IB de los niveles de HA-proteína en las IP. (B y C) Titulación de la actividad quinasa de PIP5KI $\beta$ , PIP5KI $\beta$ -L y PIP5KI $\beta$ -LPF purificadas por cromatografía de afinidad (ng de proteína). TLC del PIP<sub>2</sub> y sus

valores correspondientes de densitometría (UR). Se representa la actividad quinasa (en cpm) en función de la cantidad de proteína.

Titulamos la actividad quinasa de las proteínas PIP5KI $\beta$ , PIP5KI $\beta$ -L y PIP5KI $\beta$ -LPF purificadas. La actividad del mutante PIP5KI $\beta$ -L disminuyó 5 veces con relación a la de PIP5KI $\beta$ , mientras que el mutante PIP5KI $\beta$ -LPF presentó solamente actividad residual,  $\sim 2$  órdenes de magnitud inferior a la enzima nativa (Fig. 47B y C). Estos resultados muestran una correlación entre las modificaciones en el motivo de dimerización y la actividad quinasa; leves alteraciones en la  $\alpha$ -hélice (PIP5KI $\beta$ -L) tienen modestos efectos en la actividad quinasa, mientras que modificaciones drásticas en la estructura del dominio de dimerización (PIP5KI $\beta$ -LPF) provocan disminuciones considerables en la producción de PIP2.



# Discusión



# Conclusiones







# Bibliografía



## 7. Bibliografia

Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 66, 213-221.

Alblas, J., Ulfman, L., Hordijk, P., and Koenderman, L. (2001). Activation of RhoA and ROCK are essential for detachment of migrating leukocytes. *Molecular biology of the cell* 12, 2137-2145.

Amacher, J.F., Cushing, P.R., Bahl, C.D., Beck, T., and Madden, D.R. (2013). Stereochemical determinants of C-terminal specificity in PDZ peptide-binding domains: a novel contribution of the carboxylate-binding loop. *The Journal of biological chemistry* 288, 5114-5126.

Anderson, R.A., Boronenkov, I.V., Doughman, S.D., Kunz, J., and Loijens, J.C. (1999). Phosphatidylinositol phosphate kinases, a multifaceted family of signaling enzymes. *The Journal of biological chemistry* 274, 9907-9910.

Anderson, R.A., and Marchesi, V.T. (1985). Regulation of the association of membrane skeletal protein 4.1 with glycophorin by a polyphosphoinositide. *Nature* 318, 295-298.

Andreev, J., Simon, J.P., Sabatini, D.D., Kam, J., Plowman, G., Randazzo, P.A., and Schlessinger, J. (1999). Identification of a new Pyk2 target protein with Arf-GAP activity. *Molecular and cellular biology* 19, 2338-2350.

Ardura, J.A., and Friedman, P.A. (2011). Regulation of G protein-coupled receptor function by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulatory factors. *Pharmacological reviews* 63, 882-900.

Arioka, M., Nakashima, S., Shibasaki, Y., and Kitamoto, K. (2004). Dibasic amino acid residues at the carboxy-terminal end of kinase homology domain participate in the plasma membrane localization and function of phosphatidylinositol 5-kinase gamma. *Biochemical and biophysical research communications* 319, 456-463.

Bairstow, S.F., Ling, K., Su, X., Firestone, A.J., Carbonara, C., and Anderson, R.A. (2006). Type Iggamma661 phosphatidylinositol phosphate kinase directly interacts with AP2 and regulates endocytosis. *The Journal of biological chemistry* 281, 20632-20642.

- Balana, B., Maslennikov, I., Kwiatkowski, W., Stern, K.M., Bahima, L., Choe, S., and Slesinger, P.A. (2011). Mechanism underlying selective regulation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channels by the psychostimulant-sensitive sorting nexin 27. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5831-5836.
- Barlow, C.A., Laishram, R.S., and Anderson, R.A. (2010). Nuclear phosphoinositides: a signaling enigma wrapped in a compartmental conundrum. *Trends in cell biology* 20, 25-35.
- Barsukov, I.L., Prescott, A., Bate, N., Patel, B., Floyd, D.N., Bhanji, N., Bagshaw, C.R., Letinic, K., Di Paolo, G., De Camilli, P. (2003). Phosphatidylinositol phosphate kinase type 1gamma and beta1-integrin cytoplasmic domain bind to the same region in the talin FERM domain. *The Journal of biological chemistry* 278, 31202-31209.
- Bazenet, C.E., Ruano, A.R., Brockman, J.L., and Anderson, R.A. (1990). The human erythrocyte contains two forms of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase which are differentially active toward membranes. *The Journal of biological chemistry* 265, 18012-18022.
- Bhattacharya, S., Dai, Z., Li, J., Baxter, S., Callaway, D.J., Cowburn, D., and Bu, Z. (2010). A conformational switch in the scaffolding protein NHERF1 controls autoinhibition and complex formation. *The Journal of biological chemistry* 285, 9981-9994.
- Bhattacharya, S., Ju, J.H., Orlova, N., Khajeh, J.A., Cowburn, D., and Bu, Z. (2013). Ligand-induced dynamic changes in extended PDZ domains from NHERF1. *Journal of molecular biology* 425, 2509-2528.
- Birrane, G., Chung, J., and Ladas, J.A. (2003). Novel mode of ligand recognition by the Erbin PDZ domain. *The Journal of biological chemistry* 278, 1399-1402.
- Boronenkov, I.V., and Anderson, R.A. (1995). The sequence of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase defines a novel family of lipid kinases. *The Journal of biological chemistry* 270, 2881-2884.
- Boronenkov, I.V., Loijens, J.C., Umeda, M., and Anderson, R.A. (1998). Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Molecular biology of the cell* 9, 3547-3560.
- Bourgoin, S.G., Houle, M.G., Singh, I.N., Harbour, D., Gagnon, S., Morris, A.J., and Brindley, D.N. (2002). ARNO but not cytohesin-1 translocation is phosphatidylinositol 3-kinase-dependent in HL-60 cells. *Journal of leukocyte biology* 71, 718-728.

- Bretscher, A., Edwards, K., and Fehon, R.G. (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 586-599.
- Bultsma, Y., Keune, W.J., and Divecha, N. (2010). PIP4Kbeta interacts with and modulates nuclear localization of the high-activity PtdIns5P-4-kinase isoform PIP4Kalpha. *The Biochemical journal* 430, 223-235.
- Burden, L.M., Rao, V.D., Murray, D., Ghirlando, R., Doughman, S.D., Anderson, R.A., and Hurley, J.H. (1999). The flattened face of type II beta phosphatidylinositol phosphate kinase binds acidic phospholipid membranes. *Biochemistry* 38, 15141-15149.
- Campello, S., Lacalle, R.A., Bettella, M., Manes, S., Scorrano, L., and Viola, A. (2006). Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics. *The Journal of experimental medicine* 203, 2879-2886.
- Cao, T.T., Deacon, H.W., Reczek, D., Bretscher, A., and von Zastrow, M. (1999). A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 401, 286-290.
- Castellino, A.M., Parker, G.J., Boronenkov, I.V., Anderson, R.A., and Chao, M.V. (1997). A novel interaction between the juxtamembrane region of the p55 tumor necrosis factor receptor and phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *The Journal of biological chemistry* 272, 5861-5870.
- Chen, M.Z., Zhu, X., Sun, H.Q., Mao, Y.S., Wei, Y., Yamamoto, M., and Yin, H.L. (2009). Oxidative stress decreases phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels by deactivating phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase beta in a Syk-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 284, 23743-23753.
- Cheng, H., Li, J., Fazlieva, R., Dai, Z., Bu, Z., and Roder, H. (2009). Autoinhibitory interactions between the PDZ2 and C-terminal domains in the scaffolding protein NHERF1. *Structure* 17, 660-669.
- Chi, C.N., Bach, A., Stromgaard, K., Gianni, S., and Jemth, P. (2012). Ligand binding by PDZ domains. *BioFactors* 38, 338-348.
- Cho, K.O., Hunt, C.A., and Kennedy, M.B. (1992). The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9, 929-942.

- Clarke, J.H., and Irvine, R.F. (2013). Evolutionarily conserved structural changes in phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase (PI5P4K) isoforms are responsible for differences in enzyme activity and localization. *The Biochemical journal* 454, 49-57.
- Coppolino, M.G., Dierckman, R., Loijens, J., Collins, R.F., Pouladi, M., Jongstra-Bilen, J., Schreiber, A.D., Trimble, W.S., Anderson, R., and Grinstein, S. (2002). Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase Ialpha impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis. *The Journal of biological chemistry* 277, 43849-43857.
- Cox, S., Radzio-Andzelm, E., and Taylor, S.S. (1994). Domain movements in protein kinases. *Current opinion in structural biology* 4, 893-901.
- Cushing, P.R., Fellows, A., Villone, D., Boisguerin, P., and Madden, D.R. (2008). The relative binding affinities of PDZ partners for CFTR: a biochemical basis for efficient endocytic recycling. *Biochemistry* 47, 10084-10098.
- D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 347-358.
- Daniels, D.L., Cohen, A.R., Anderson, J.M., and Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of the hCASK PDZ domain reveals the structural basis of class II PDZ domain target recognition. *Nature structural biology* 5, 317-325.
- de Lucas, S., Peredo, J., Marion, R.M., Sanchez, C., and Ortin, J. (2010). Human Staufen1 protein interacts with influenza virus ribonucleoproteins and is required for efficient virus multiplication. *Journal of virology* 84, 7603-7612.
- de Pereda, J.M., Wegener, K.L., Santelli, E., Bate, N., Ginsberg, M.H., Critchley, D.R., Campbell, I.D., and Liddington, R.C. (2005). Structural basis for phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma binding to talin at focal adhesions. *The Journal of biological chemistry* 280, 8381-8386.
- del Pozo, M.A., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Serrador, J.M., and Sanchez-Madrid, F. (1999). Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *European journal of immunology* 29, 3609-3620.
- Delmas, P., Coste, B., Gamper, N., and Shapiro, M.S. (2005). Phosphoinositide lipid second messengers: new paradigms for calcium channel modulation. *Neuron* 47, 179-182.



- Desrivieres, S., Cooke, F.T., Parker, P.J., and Hall, M.N. (1998). MSS4, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 273, 15787-15793.
- Di Paolo, G., Pellegrini, L., Letinic, K., Cestra, G., Zoncu, R., Voronov, S., Chang, S., Guo, J., Wenk, M.R., and De Camilli, P. (2002). Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type 1 gamma by the FERM domain of talin. *Nature* 420, 85-89.
- Divecha, N. (2010). Lipid kinases: charging PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> synthesis. *Current biology : CB* 20, R154-157.
- Divecha, N., Roefs, M., Halstead, J.R., D'Andrea, S., Fernandez-Borga, M., Oomen, L., Saqib, K.M., Wakelam, M.J., and D'Santos, C. (2000). Interaction of the type Ialpha PIPkinase with phospholipase D: a role for the local generation of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate in the regulation of PLD2 activity. *The EMBO journal* 19, 5440-5449.
- Divecha, N., Truong, O., Hsuan, J.J., Hinchliffe, K.A., and Irvine, R.F. (1995). The cloning and sequence of the C isoform of PtdIns4P 5-kinase. *The Biochemical journal* 309 ( Pt 3), 715-719.
- Donowitz, M., Cha, B., Zachos, N.C., Brett, C.L., Sharma, A., Tse, C.M., and Li, X. (2005). NHERF family and NHE3 regulation. *The Journal of physiology* 567, 3-11.
- Douette, P., Navet, R., Gerkens, P., Galleni, M., Levy, D., and Sluse, F.E. (2005). *Escherichia coli* fusion carrier proteins act as solubilizing agents for recombinant uncoupling protein 1 through interactions with GroEL. *Biochemical and biophysical research communications* 333, 686-693.
- Doughman, R.L., Firestone, A.J., and Anderson, R.A. (2003a). Phosphatidylinositol phosphate kinases put PI4,5P(2) in its place. *The Journal of membrane biology* 194, 77-89.
- Doughman, R.L., Firestone, A.J., Wojtasiak, M.L., Bunce, M.W., and Anderson, R.A. (2003b). Membrane ruffling requires coordination between type Ialpha phosphatidylinositol phosphate kinase and Rac signaling. *The Journal of biological chemistry* 278, 23036-23045.
- Downes, C.P., Gray, A., and Lucocq, J.M. (2005). Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking. *Trends in cell biology* 15, 259-268.
- Doyle, D.A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., and MacKinnon, R. (1996). Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85, 1067-1076.

- Elge, S., Brearley, C., Xia, H.J., Kehr, J., Xue, H.W., and Mueller-Roeber, B. (2001). An Arabidopsis inositol phospholipid kinase strongly expressed in procambial cells: synthesis of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> in insect cells by 5-phosphorylation of precursors. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 26, 561-571.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 66, 486-501.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.Y., Pieper, U., and Sali, A. (2006). Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D Baxevanis* Chapter 5, Unit 5 6.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Fairn, G.D., Ogata, K., Botelho, R.J., Stahl, P.D., Anderson, R.A., De Camilli, P., Meyer, T., Wodak, S., and Grinstein, S. (2009). An electrostatic switch displaces phosphatidylinositol phosphate kinases from the membrane during phagocytosis. *The Journal of cell biology* 187, 701-714.
- Feng, W., Wu, H., Chan, L.N., and Zhang, M. (2008). Par-3-mediated junctional localization of the lipid phosphatase PTEN is required for cell polarity establishment. *The Journal of biological chemistry* 283, 23440-23449.
- Fievet, B.T., Gautreau, A., Roy, C., Del Maestro, L., Mangeat, P., Louvard, D., and Arpin, M. (2004). Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *The Journal of cell biology* 164, 653-659.
- Finnerty, C.M., Chambers, D., Ingraffea, J., Faber, H.R., Karplus, P.A., and Bretscher, A. (2004). The EBP50-moesin interaction involves a binding site regulated by direct masking on the FERM domain. *Journal of cell science* 117, 1547-1552.
- Fouassier, L., Yun, C.C., Fitz, J.G., and Doctor, R.B. (2000). Evidence for ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (EBP50) self-association through PDZ-PDZ interactions. *The Journal of biological chemistry* 275, 25039-25045.
- Funakoshi, Y., Hasegawa, H., and Kanaho, Y. (2011). Regulation of PIP5K activity by Arf6 and its physiological significance. *Journal of cellular physiology* 226, 888-895.

- Gary, J.D., Wurmser, A.E., Bonangelino, C.J., Weisman, L.S., and Emr, S.D. (1998). Fab1p is essential for PtdIns(3)P 5-kinase activity and the maintenance of vacuolar size and membrane homeostasis. *The Journal of cell biology* 143, 65-79.
- Gatla, H.R., Singha, B., Persaud, V., and Vancurova, I. (2014). Evaluating cytoplasmic and nuclear levels of inflammatory cytokines in cancer cells by western blotting. *Methods in molecular biology* 1172, 271-283.
- Gavrilescu, L.C., and Van Etten, R.A. (2007). Production of replication-defective retrovirus by transient transfection of 293T cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 550.
- Giudici, M.L., Hinchliffe, K.A., and Irvine, R.F. (2004). Phosphatidylinositol phosphate kinases. *Journal of endocrinological investigation* 27, 137-142.
- Giudici, M.L., Lee, K., Lim, R., and Irvine, R.F. (2006). The intracellular localisation and mobility of Type Igamm phosphatidylinositol 4P 5-kinase splice variants. *FEBS letters* 580, 6933-6937.
- Gong, K., Ouyang, T., and Herzberg, M.C. (1998). A streptococcal adhesion system for salivary pellicle and platelets. *Infection and immunity* 66, 5388-5392.
- Good, M.C., Zalatan, J.G., and Lim, W.A. (2011). Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* 332, 680-686.
- Gratacap, M.P., Payraastre, B., Nieswandt, B., and Offermanns, S. (2001). Differential regulation of Rho and Rac through heterotrimeric G-proteins and cyclic nucleotides. *The Journal of biological chemistry* 276, 47906-47913.
- Grembecka, J., Cierpicki, T., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Kang, B.S., Bushweller, J.H., and Derewenda, Z.S. (2006). The binding of the PDZ tandem of syntenin to target proteins. *Biochemistry* 45, 3674-3683.
- Gueret, V., Negrete-Virgen, J.A., Lyddiatt, A., and Al-Rubeai, M. (2002). Rapid titration of adenoviral infectivity by flow cytometry in batch culture of infected HEK293 cells. *Cytotechnology* 38, 87-97.
- Hall, R.A., Ostedgaard, L.S., Premont, R.T., Blitzler, J.T., Rahman, N., Welsh, M.J., and Lefkowitz, R.J. (1998a). A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger

regulatory factor family of PDZ proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8496-8501.

Hall, R.A., Premont, R.T., Chow, C.W., Blitzer, J.T., Pitcher, J.A., Claing, A., Stoffel, R.H., Barak, L.S., Shenolikar, S., Weinman, E.J. (1998b). The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger regulatory factor to control Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Nature* 392, 626-630.

Hall, R.A., Spurney, R.F., Premont, R.T., Rahman, N., Blitzer, J.T., Pitcher, J.A., and Lefkowitz, R.J. (1999). G protein-coupled receptor kinase 6A phosphorylates the Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger regulatory factor via a PDZ domain-mediated interaction. *The Journal of biological chemistry* 274, 24328-24334.

Halstead, J.R., Roefs, M., Ellson, C.D., D'Andrea, S., Chen, C., D'Santos, C.S., and Divecha, N. (2001). A novel pathway of cellular phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis is regulated by oxidative stress. *Current biology : CB* 11, 386-395.

Halstead, J.R., Savaskan, N.E., van den Bout, I., Van Horck, F., Hajdo-Milasinovic, A., Snell, M., Keune, W.J., Ten Klooster, J.P., Hordijk, P.L., and Divecha, N. (2010). Rac controls PIP5K localisation and PtdIns(4,5)P(2) synthesis, which modulates vinculin localisation and neurite dynamics. *Journal of cell science* 123, 3535-3546.

Harris, B.Z., and Lim, W.A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *Journal of cell science* 114, 3219-3231.

Harrison, S.M., Knifley, T., Chen, M., and O'Connor, K.L. (2013). LPA, HGF, and EGF utilize distinct combinations of signaling pathways to promote migration and invasion of MDA-MB-231 breast carcinoma cells. *BMC cancer* 13, 501.

Hashimoto, S., Hashimoto, A., Yamada, A., Kojima, C., Yamamoto, H., Tsutsumi, T., Higashi, M., Mizoguchi, A., Yagi, R., and Sabe, H. (2004). A novel mode of action of an ArfGAP, AMAP2/PAG3/Papa lpha, in Arf6 function. *The Journal of biological chemistry* 279, 37677-37684.

Hay, J.C., Fiset, P.L., Jenkins, G.H., Fukami, K., Takenawa, T., Anderson, R.A., and Martin, T.F. (1995). ATP-dependent inositide phosphorylation required for Ca<sup>(2+)</sup>-activated secretion. *Nature* 374, 173-177.

He, B., Xi, F., Zhang, X., Zhang, J., and Guo, W. (2007). Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane. *The EMBO journal* 26, 4053-4065.

- Heck, J.N., Mellman, D.L., Ling, K., Sun, Y., Wagoner, M.P., Schill, N.J., and Anderson, R.A. (2007). A conspicuous connection: structure defines function for the phosphatidylinositol-phosphate kinase family. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 42, 15-39.
- Hernandez-Deviez, D.J., Roth, M.G., Casanova, J.E., and Wilson, J.M. (2004). ARNO and ARF6 regulate axonal elongation and branching through downstream activation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha. *Molecular biology of the cell* 15, 111-120.
- Hillier, B.J., Christopherson, K.S., Prehoda, K.E., Brecht, D.S., and Lim, W.A. (1999). Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science* 284, 812-815.
- Hinchliffe, K.A., Giudici, M.L., Letcher, A.J., and Irvine, R.F. (2002). Type IIalpha phosphatidylinositol phosphate kinase associates with the plasma membrane via interaction with type I isoforms. *The Biochemical journal* 363, 563-570.
- Hirosawa, M., Hoshida, M., Ishikawa, M., and Toya, T. (1993). MASCOT: multiple alignment system for protein sequences based on three-way dynamic programming. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* 9, 161-167.
- Hokin, L.E. (1969). Functional activity in glands and synaptic tissue and the turnover of phosphatidylinositol. *Annals of the New York Academy of Sciences* 165, 695-709.
- Hokin, L.E. (1985). Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. *Annual review of biochemistry* 54, 205-235.
- Holcomb, J., Jiang, Y., Guan, X., Trescott, L., Lu, G., Hou, Y., Wang, S., Brunzelle, J., Sirinpong, N., Li, C. (2014). Crystal structure of the NHERF1 PDZ2 domain in complex with the chemokine receptor CXCR2 reveals probable modes of PDZ2 dimerization. *Biochemical and biophysical research communications* 448, 169-174.
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A.J., Frohman, M.A. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99, 521-532.
- Hu, Y.C. (2005). Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta pharmacologica Sinica* 26, 405-416.

- Hurd, T.W., Gao, L., Roh, M.H., Macara, I.G., and Margolis, B. (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nature cell biology* 5, 137-142.
- Hurley, J.H., and Grobler, J.A. (1997). Protein kinase C and phospholipase C: bilayer interactions and regulation. *Current opinion in structural biology* 7, 557-565.
- Ishihara, H., Shibasaki, Y., Kizuki, N., Katagiri, H., Yazaki, Y., Asano, T., and Oka, Y. (1996). Cloning of cDNAs encoding two isoforms of 68-kDa type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *The Journal of biological chemistry* 271, 23611-23614.
- Ishihara, H., Shibasaki, Y., Kizuki, N., Wada, T., Yazaki, Y., Asano, T., and Oka, Y. (1998). Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases. Cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. *The Journal of biological chemistry* 273, 8741-8748.
- Itoh, T., Ijuin, T., and Takenawa, T. (1998). A novel phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase (phosphatidylinositol-phosphate kinase IIgamma) is phosphorylated in the endoplasmic reticulum in response to mitogenic signals. *The Journal of biological chemistry* 273, 20292-20299.
- Ivarsson, Y. (2012). Plasticity of PDZ domains in ligand recognition and signaling. *FEBS letters* 586, 2638-2647.
- Jafferji, S.S., and Michell, R.H. (1976). Effects of calcium-antagonistic drugs on the stimulation by carbamoylcholine and histamine of phosphatidylinositol turnover in longitudinal smooth muscle of guinea-pig ileum. *The Biochemical journal* 160, 163-169.
- Janmey, P.A., and Stossel, T.P. (1987). Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature* 325, 362-364.
- Jemth, P., and Gianni, S. (2007). PDZ domains: folding and binding. *Biochemistry* 46, 8701-8708.
- Jerga, A., Miller, D.J., White, S.W., and Rock, C.O. (2009). Molecular determinants for interfacial binding and conformational change in a soluble diacylglycerol kinase. *The Journal of biological chemistry* 284, 7246-7254.
- Jones, D.H., Morris, J.B., Morgan, C.P., Kondo, H., Irvine, R.F., and Cockcroft, S. (2000). Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase directly interacts with ADP-ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the golgi compartment. *The Journal of biological chemistry* 275, 13962-13966.

- Kabsch, W. (2010). Xds. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 66, 125-132.
- Kahlfeldt, N., Vahedi-Faridi, A., Koo, S.J., Schafer, J.G., Krainer, G., Keller, S., Saenger, W., Krauss, M., and Haucke, V. (2010). Molecular basis for association of PIPKI gamma-p90 with clathrin adaptor AP-2. *The Journal of biological chemistry* 285, 2734-2749.
- Kam, J.L., Miura, K., Jackson, T.R., Gruschus, J., Roller, P., Stauffer, S., Clark, J., Aneja, R., and Randazzo, P.A. (2000). Phosphoinositide-dependent activation of the ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein ASAP1. Evidence for the pleckstrin homology domain functioning as an allosteric site. *The Journal of biological chemistry* 275, 9653-9663.
- Kapust, R.B., and Waugh, D.S. (1999). Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein science : a publication of the Protein Society* 8, 1668-1674.
- Karthikeyan, S., Leung, T., Birrane, G., Webster, G., and Ldias, J.A. (2001a). Crystal structure of the PDZ1 domain of human Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor provides insights into the mechanism of carboxyl-terminal leucine recognition by class I PDZ domains. *Journal of molecular biology* 308, 963-973.
- Karthikeyan, S., Leung, T., and Ldias, J.A. (2001b). Structural basis of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor PDZ1 interaction with the carboxyl-terminal region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *The Journal of biological chemistry* 276, 19683-19686.
- Karthikeyan, S., Leung, T., and Ldias, J.A. (2002). Structural determinants of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor interaction with the beta 2 adrenergic and platelet-derived growth factor receptors. *The Journal of biological chemistry* 277, 18973-18978.
- Katoh, K., and Standley, D.M. (2014). MAFFT: iterative refinement and additional methods. *Methods in molecular biology* 1079, 131-146.
- Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y.N., and Sheng, M. (1995). Clustering of Shaker-type K<sup>+</sup> channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 378, 85-88.
- Kisseleva, M., Feng, Y., Ward, M., Song, C., Anderson, R.A., and Longmore, G.D. (2005). The LIM protein Ajuba regulates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels in migrating cells

through an interaction with and activation of PIPKI alpha. *Molecular and cellular biology* 25, 3956-3966.

Klarlund, J.K., Rameh, L.E., Cantley, L.C., Buxton, J.M., Holik, J.J., Sakelis, C., Patki, V., Corvera, S., and Czech, M.P. (1998). Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry* 273, 1859-1862.

Kondo, A., Hashimoto, S., Yano, H., Nagayama, K., Mazaki, Y., and Sabe, H. (2000). A new paxillin-binding protein, PAG3/Papalpha/KIAA0400, bearing an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein activity, is involved in paxillin recruitment to focal adhesions and cell migration. *Molecular biology of the cell* 11, 1315-1327.

Kozlov, G., Banville, D., Gehring, K., and Ekiel, I. (2002). Solution structure of the PDZ2 domain from cytosolic human phosphatase hPTP1E complexed with a peptide reveals contribution of the beta2-beta3 loop to PDZ domain-ligand interactions. *Journal of molecular biology* 320, 813-820.

Kozlov, G., Gehring, K., and Ekiel, I. (2000). Solution structure of the PDZ2 domain from human phosphatase hPTP1E and its interactions with C-terminal peptides from the Fas receptor. *Biochemistry* 39, 2572-2580.

Krauss, M., Kinuta, M., Wenk, M.R., De Camilli, P., Takei, K., and Haucke, V. (2003). ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. *The Journal of cell biology* 162, 113-124.

Krauss, M., Kukhtina, V., Pechstein, A., and Haucke, V. (2006). Stimulation of phosphatidylinositol kinase type I-mediated phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate synthesis by AP-2mu-cargo complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 11934-11939.

Kunz, J., Fuelling, A., Kolbe, L., and Anderson, R.A. (2002). Stereo-specific substrate recognition by phosphatidylinositol phosphate kinases is swapped by changing a single amino acid residue. *The Journal of biological chemistry* 277, 5611-5619.

Kunz, J., Wilson, M.P., Kisseleva, M., Hurley, J.H., Majerus, P.W., and Anderson, R.A. (2000). The activation loop of phosphatidylinositol phosphate kinases determines signaling specificity. *Molecular cell* 5, 1-11.



- Kwiatkowska, K. (2010). One lipid, multiple functions: how various pools of PI(4,5)P(2) are created in the plasma membrane. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 67, 3927-3946.
- Lacalle, R.A., de Karam, J.C., Martinez-Munoz, L., Artetxe, I., Peregil, R.M., Sot, J., Rojas, A.M., Goni, F.M., Mellado, M., and Manes, S. (2015). Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase homo- and heterodimerization determines its membrane localization and activity. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.
- Lacalle, R.A., Peregil, R.M., Albar, J.P., Merino, E., Martinez, A.C., Merida, I., and Manes, S. (2007). Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase controls neutrophil polarity and directional movement. *The Journal of cell biology* 179, 1539-1553.
- Lamprecht, G., and Seidler, U. (2006). The emerging role of PDZ adapter proteins for regulation of intestinal ion transport. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 291, G766-777.
- Lassing, I., and Lindberg, U. (1985). Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* 314, 472-474.
- Lau, A.G., and Hall, R.A. (2001). Oligomerization of NHERF-1 and NHERF-2 PDZ domains: differential regulation by association with receptor carboxyl-termini and by phosphorylation. *Biochemistry* 40, 8572-8580.
- Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.
- Lawrence, J.T., and Birnbaum, M.J. (2003). ADP-ribosylation factor 6 regulates insulin secretion through plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13320-13325.
- Le Guilloux, V., Schmidtke, P., and Tuffery, P. (2009). Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection. *BMC bioinformatics* 10, 168.
- Lee, J.H., Katakai, T., Hara, T., Gonda, H., Sugai, M., and Shimizu, A. (2004). Roles of p-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation. *The Journal of cell biology* 167, 327-337.

- Lee, S.Y., Voronov, S., Letinic, K., Nairn, A.C., Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2005). Regulation of the interaction between PIPKI gamma and talin by proline-directed protein kinases. *The Journal of cell biology* 168, 789-799.
- Li, J., Poulikakos, P.I., Dai, Z., Testa, J.R., Callaway, D.J., and Bu, Z. (2007). Protein kinase C phosphorylation disrupts Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 1 autoinhibition and promotes cystic fibrosis transmembrane conductance regulator macromolecular assembly. *The Journal of biological chemistry* 282, 27086-27099.
- Ling, K., Bairstow, S.F., Carbonara, C., Turbin, D.A., Huntsman, D.G., and Anderson, R.A. (2007). Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase modulates adherens junction and E-cadherin trafficking via a direct interaction with mu 1B adaptin. *The Journal of cell biology* 176, 343-353.
- Ling, K., Doughman, R.L., Firestone, A.J., Bunce, M.W., and Anderson, R.A. (2002). Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature* 420, 89-93.
- Ling, K., Doughman, R.L., Iyer, V.V., Firestone, A.J., Bairstow, S.F., Mosher, D.F., Schaller, M.D., and Anderson, R.A. (2003). Tyrosine phosphorylation of type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase by Src regulates an integrin-talin switch. *The Journal of cell biology* 163, 1339-1349.
- Ling, K., Schill, N.J., Wagoner, M.P., Sun, Y., and Anderson, R.A. (2006). Movin' on up: the role of PtdIns(4,5)P(2) in cell migration. *Trends in cell biology* 16, 276-284.
- Loijens, J.C., and Anderson, R.A. (1996). Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases are distinct members of this novel lipid kinase family. *The Journal of biological chemistry* 271, 32937-32943.
- Lokuta, M.A., Senetar, M.A., Bennin, D.A., Nuzzi, P.A., Chan, K.T., Ott, V.L., and Huttenlocher, A. (2007). Type I gamma PIP kinase is a novel uropod component that regulates rear retraction during neutrophil chemotaxis. *Molecular biology of the cell* 18, 5069-5080.
- London, T.B., Lee, H.J., Shao, Y., and Zheng, J. (2004). Interaction between the internal motif KTXXXI of Idax and mDvl PDZ domain. *Biochemical and biophysical research communications* 322, 326-332.

- Lu, G., Wu, Y., Jiang, Y., Wang, S., Hou, Y., Guan, X., Brunzelle, J., Sirinupong, N., Sheng, S., Li, C. (2013). Structural insights into neutrophilic migration revealed by the crystal structure of the chemokine receptor CXCR2 in complex with the first PDZ domain of NHERF1. *PloS one* 8, e76219.
- Luck, K., Charbonnier, S., and Trave, G. (2012). The emerging contribution of sequence context to the specificity of protein interactions mediated by PDZ domains. *FEBS letters* 586, 2648-2661.
- Mahon, M.J., Donowitz, M., Yun, C.C., and Segre, G.V. (2002). Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger regulatory factor 2 directs parathyroid hormone 1 receptor signalling. *Nature* 417, 858-861.
- Mahon, M.J., and Segre, G.V. (2004). Stimulation by parathyroid hormone of a NHERF-1-assembled complex consisting of the parathyroid hormone I receptor, phospholipase C $\beta$ , and actin increases intracellular calcium in opossum kidney cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 23550-23558.
- Mamonova, T., Kurnikova, M., and Friedman, P.A. (2012). Structural basis for NHERF1 PDZ domain binding. *Biochemistry* 51, 3110-3120.
- Mañes, S., Fuentes, G., Peregil, R.M., Rojas, A.M., and Lacalle, R.A. (2010). An isoform-specific PDZ-binding motif targets type I PIP5 kinase  $\beta$  to the uropod and controls polarization of neutrophil-like HL60 cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 3381-3392.
- Mañes, S., Gomez-Mouton, C., Lacalle, R.A., Jimenez-Baranda, S., Mira, E., and Martinez, A.C. (2005). Mastering time and space: immune cell polarization and chemotaxis. *Seminars in immunology* 17, 77-86.
- Mañes, S., Mira, E., Gomez-Mouton, C., Lacalle, R.A., Keller, P., Labrador, J.P., and Martinez, A.C. (1999). Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells. *The EMBO journal* 18, 6211-6220.
- Mao, Y.S., and Yin, H.L. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton by phosphatidylinositol 4-phosphate 5 kinases. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 455, 5-18.
- Martin, T.F. (2001). PI(4,5)P<sub>2</sub> regulation of surface membrane traffic. *Current opinion in cell biology* 13, 493-499.

- Martínez Muñoz, L., Lucas, P., Navarro, G., Checa, A.I., Franco, R., Martinez, A.C., Rodriguez-Frade, J.M., and Mellado, M. (2009). Dynamic regulation of CXCR1 and CXCR2 homo- and heterodimers. *Journal of immunology* 183, 7337-7346.
- Martínez-Muñoz, L., Barroso, R., Dyrhaug, S.Y., Navarro, G., Lucas, P., Soriano, S.F., Vega, B., Costas, C., Munoz-Fernandez, M.A., Santiago, C. (2014). CCR5/CD4/CXCR4 oligomerization prevents HIV-1 gp120IIIB binding to the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E1960-1969.
- Mathis, L., Wernimont, S., Affentranger, S., Huttenlocher, A., and Niggli, V. (2013). Determinants of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type Igama90 uropod location in T-lymphocytes and its role in uropod formation. *PeerJ* 1, e131.
- Matsui, T., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1999). Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidyl-inositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Current biology : CB* 9, 1259-1262.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* 40, 658-674.
- Mellman, D.L., Gonzales, M.L., Song, C., Barlow, C.A., Wang, P., Kendzierski, C., and Anderson, R.A. (2008). A PtdIns4,5P2-regulated nuclear poly(A) polymerase controls expression of select mRNAs. *Nature* 451, 1013-1017.
- Minkoff, C., Shenolikar, S., and Weinman, E.J. (1999). Assembly of signaling complexes by the sodium-hydrogen exchanger regulatory factor family of PDZ-containing proteins. *Current opinion in nephrology and hypertension* 8, 603-608.
- Moon, A.F., Mueller, G.A., Zhong, X., and Pedersen, L.C. (2010). A synergistic approach to protein crystallization: combination of a fixed-arm carrier with surface entropy reduction. *Protein science : a publication of the Protein Society* 19, 901-913.
- Morales, F.C., Takahashi, Y., Momin, S., Adams, H., Chen, X., and Georgescu, M.M. (2007). NHERF1/EBP50 head-to-tail intramolecular interaction masks association with PDZ domain ligands. *Molecular and cellular biology* 27, 2527-2537.
- Mortier, E., Wuytens, G., Leenaerts, I., Hannes, F., Heung, M.Y., Degeest, G., David, G., and Zimmermann, P. (2005). Nuclear speckles and nucleoli targeting by PIP2-PDZ domain interactions. *The EMBO journal* 24, 2556-2565.

- Motulsky, H.J., and Brown, R.E. (2006). Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC bioinformatics* 7, 123.
- Moyer, B.D., Duhaime, M., Shaw, C., Denton, J., Reynolds, D., Karlson, K.H., Pfeiffer, J., Wang, S., Mickle, J.E., Milewski, M. (2000). The PDZ-interacting domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is required for functional expression in the apical plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 275, 27069-27074.
- Nakano-Kobayashi, A., Yamazaki, M., Unoki, T., Hongu, T., Murata, C., Taguchi, R., Katada, T., Frohman, M.A., Yokozeki, T., and Kanaho, Y. (2007). Role of activation of PIP5Kgamma661 by AP-2 complex in synaptic vesicle endocytosis. *The EMBO journal* 26, 1105-1116.
- Ng, Y., Tan, I., Lim, L., and Leung, T. (2004). Expression of the human myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase gamma is regulated by promoter DNA methylation and Sp1 binding. *The Journal of biological chemistry* 279, 34156-34164.
- Nie, Z., Stanley, K.T., Stauffer, S., Jacques, K.M., Hirsch, D.S., Takei, J., and Randazzo, P.A. (2002). AGAP1, an endosome-associated, phosphoinositide-dependent ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein that affects actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* 277, 48965-48975.
- Nieto, M., Rodriguez-Fernandez, J.L., Navarro, F., Sancho, D., Frade, J.M., Mellado, M., Martinez, A.C., Cabanas, C., and Sanchez-Madrid, F. (1999). Signaling through CD43 induces natural killer cell activation, chemokine release, and PYK-2 activation. *Blood* 94, 2767-2777.
- Noda, Y., Niwa, S., Homma, N., Fukuda, H., Imajo-Ohmi, S., and Hirokawa, N. (2012). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha (PIPKalpha) regulates neuronal microtubule depolymerase kinesin, KIF2A and suppresses elongation of axon branches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1725-1730.
- Oude Weernink, P.A., Schmidt, M., and Jakobs, K.H. (2004). Regulation and cellular roles of phosphoinositide 5-kinases. *European journal of pharmacology* 500, 87-99.
- Oude Weernink, P.A., Schulte, P., Guo, Y., Wetzel, J., Amano, M., Kaibuchi, K., Haverland, S., Voss, M., Schmidt, M., Mayr, G.W. (2000). Stimulation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase by Rho-kinase. *The Journal of biological chemistry* 275, 10168-10174.

- Padron, D., Wang, Y.J., Yamamoto, M., Yin, H., and Roth, M.G. (2003). Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase I $\beta$  recruits AP-2 to the plasma membrane and regulates rates of constitutive endocytosis. *The Journal of cell biology* 162, 693-701.
- Palmberger, D., Rendic, D., Tauber, P., Krammer, F., Wilson, I.B., and Grabherr, R. (2011). Insect cells for antibody production: evaluation of an efficient alternative. *Journal of biotechnology* 153, 160-166.
- Pan, L., Wu, H., Shen, C., Shi, Y., Jin, W., Xia, J., and Zhang, M. (2007). Clustering and synaptic targeting of PICK1 requires direct interaction between the PDZ domain and lipid membranes. *The EMBO journal* 26, 4576-4587.
- Pan, W., Choi, S.C., Wang, H., Qin, Y., Volpicelli-Daley, L., Swan, L., Lucast, L., Khoo, C., Zhang, X., Li, L. (2008). Wnt3a-mediated formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates LRP6 phosphorylation. *Science* 321, 1350-1353.
- Papac, D.I., and Shahrokh, Z. (2001). Mass spectrometry innovations in drug discovery and development. *Pharmaceutical research* 18, 131-145.
- Park, D.J., Wallick, C.J., Martyn, K.D., Lau, A.F., Jin, C., and Warn-Cramer, B.J. (2007). Akt phosphorylates Connexin43 on Ser373, a "mode-1" binding site for 14-3-3. *Cell communication & adhesion* 14, 211-226.
- Park, S.J., Itoh, T., and Takenawa, T. (2001). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type I is regulated through phosphorylation response by extracellular stimuli. *The Journal of biological chemistry* 276, 4781-4787.
- Perez-Mansilla, B., Ha, V.L., Justin, N., Wilkins, A.J., Carpenter, C.L., and Thomas, G.M. (2006). The differential regulation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases and phospholipase D1 by ADP-ribosylation factors 1 and 6. *Biochimica et biophysica acta* 1761, 1429-1442.
- Pietrement, C., Da Silva, N., Silberstein, C., James, M., Marsolais, M., Van Hoek, A., Brown, D., Pastor-Soler, N., Ameen, N., Laprade, R. (2008). Role of NHERF1, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, and cAMP in the regulation of aquaporin 9. *The Journal of biological chemistry* 283, 2986-2996.
- Prokop, M., Adam, J., Kriz, Z., Wimmerova, M., and Koca, J. (2008). TRITON: a graphical tool for ligand-binding protein engineering. *Bioinformatics* 24, 1955-1956.

- Raghuram, V., Mak, D.O., and Foskett, J.K. (2001). Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1300-1305.
- Rameh, L.E., Tolias, K.F., Duckworth, B.C., and Cantley, L.C. (1997). A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 390, 192-196.
- Rao, V.D., Misra, S., Boronenkov, I.V., Anderson, R.A., and Hurley, J.H. (1998). Structure of type IIbeta phosphatidylinositol phosphate kinase: a protein kinase fold flattened for interfacial phosphorylation. *Cell* 94, 829-839.
- Raran-Kurussi, S., and Waugh, D.S. (2012). The ability to enhance the solubility of its fusion partners is an intrinsic property of maltose-binding protein but their folding is either spontaneous or chaperone-mediated. *PloS one* 7, e49589.
- Reczek, D., Berryman, M., and Bretscher, A. (1997). Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *The Journal of cell biology* 139, 169-179.
- Reina, J., Lacroix, E., Hobson, S.D., Fernandez-Ballester, G., Rybin, V., Schwab, M.S., Serrano, L., and Gonzalez, C. (2002). Computer-aided design of a PDZ domain to recognize new target sequences. *Nature structural biology* 9, 621-627.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-1709.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology* 17, 1030-1032.
- Roach, A.N., Wang, Z., Wu, P., Zhang, F., Chan, R.B., Yonekubo, Y., Di Paolo, G., Gorfe, A.A., and Du, G. (2012). Phosphatidic acid regulation of PIPKI is critical for actin cytoskeletal reorganization. *Journal of lipid research* 53, 2598-2609.
- Rohman, M., and Harrison-Lavoie, K.J. (2000). Separation of copurifying GroEL from glutathione-S-transferase fusion proteins. *Protein expression and purification* 20, 45-47.

- Roldao, A., Oliveira, R., Carrondo, M.J., and Alves, P.M. (2009). Error assessment in recombinant baculovirus titration: evaluation of different methods. *Journal of virological methods* 159, 69-80.
- Saito, K., Tolias, K.F., Saci, A., Koon, H.B., Humphries, L.A., Scharenberg, A., Rawlings, D.J., Kinet, J.P., and Carpenter, C.L. (2003). BTK regulates PtdIns-4,5-P2 synthesis: importance for calcium signaling and PI3K activity. *Immunity* 19, 669-678.
- Sanchez-Madrid, F., and Serrador, J.M. (2009). Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 353-359.
- Sbrissa, D., Ikononov, O.C., and Shisheva, A. (1999). PIKfyve, a mammalian ortholog of yeast Fab1p lipid kinase, synthesizes 5-phosphoinositides. Effect of insulin. *The Journal of biological chemistry* 274, 21589-21597.
- Schill, N.J., and Anderson, R.A. (2009). Two novel phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type Igamma splice variants expressed in human cells display distinctive cellular targeting. *The Biochemical journal* 422, 473-482.
- Schuck, P. (2000). Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophysical journal* 78, 1606-1619.
- Sennhauser, G., and Grutter, M.G. (2008). Chaperone-assisted crystallography with DARPins. *Structure* 16, 1443-1453.
- Shao, C., Shi, X., Wehbi, H., Zambonelli, C., Head, J.F., Seaton, B.A., and Roberts, M.F. (2007). Dimer structure of an interfacially impaired phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *The Journal of biological chemistry* 282, 9228-9235.
- Sheng, M., and Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annual review of neuroscience* 24, 1-29.
- Sheng, R., Chen, Y., Yung Gee, H., Stec, E., Melowic, H.R., Blatner, N.R., Tun, M.P., Kim, Y., Kallberg, M., Fujiwara, T.K. (2012). Cholesterol modulates cell signaling and protein networking by specifically interacting with PDZ domain-containing scaffold proteins. *Nature communications* 3, 1249.
- Shenolikar, S., Voltz, J.W., Cunningham, R., and Weinman, E.J. (2004). Regulation of ion transport by the NHERF family of PDZ proteins. *Physiology* 19, 362-369.



- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry* 68, 850-858.
- Short, D.B., Trotter, K.W., Reczek, D., Kreda, S.M., Bretscher, A., Boucher, R.C., Stutts, M.J., and Milgram, S.L. (1998). An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* 273, 19797-19801.
- Shulga, Y.V., Anderson, R.A., Topham, M.K., and Epand, R.M. (2012). Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase isoforms exhibit acyl chain selectivity for both substrate and lipid activator. *The Journal of biological chemistry* 287, 35953-35963.
- Skippen, A., Jones, D.H., Morgan, C.P., Li, M., and Cockcroft, S. (2002). Mechanism of ADP ribosylation factor-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in HL60 cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 5823-5831.
- Smith, A., Carrasco, Y.R., Stanley, P., Kieffer, N., Batista, F.D., and Hogg, N. (2005). A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *The Journal of cell biology* 170, 141-151.
- Smyth, D.R., Mrozkiewicz, M.K., McGrath, W.J., Listwan, P., and Kobe, B. (2003). Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. *Protein science : a publication of the Protein Society* 12, 1313-1322.
- Songyang, Z., Fanning, A.S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Crompton, A., Chan, A.C., Anderson, J.M., and Cantley, L.C. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275, 73-77.
- Stephens, L.R., Hughes, K.T., and Irvine, R.F. (1991). Pathway of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils. *Nature* 351, 33-39.
- Stradal, T.E., Rottner, K., Disanza, A., Confalonieri, S., Innocenti, M., and Scita, G. (2004). Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends in cell biology* 14, 303-311.
- Stricker, N.L., Christopherson, K.S., Yi, B.A., Schatz, P.J., Raab, R.W., Dawes, G., Bassett, D.E., Jr., Brecht, D.S., and Li, M. (1997). PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences. *Nature biotechnology* 15, 336-342.

- Sugi, T., Oyama, T., Muto, T., Nakanishi, S., Morikawa, K., and Jingami, H. (2007). Crystal structures of autoinhibitory PDZ domain of Tamalin: implications for metabotropic glutamate receptor trafficking regulation. *The EMBO journal* 26, 2192-2205.
- Sulka, B., Lortat-Jacob, H., Terreux, R., Letourneur, F., and Rousselle, P. (2009). Tyrosine dephosphorylation of the syndecan-1 PDZ binding domain regulates syntenin-1 recruitment. *The Journal of biological chemistry* 284, 10659-10671.
- Sun, C., and Mierke, D.F. (2005). Characterization of interactions of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor-1 with the parathyroid hormone receptor and phospholipase C. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society* 65, 411-417.
- Szymanska, E., Sobota, A., Czurylo, E., and Kwiatkowska, K. (2008). Expression of PI(4,5)P<sub>2</sub>-binding proteins lowers the PI(4,5)P<sub>2</sub> level and inhibits FcγRIIA-mediated cell spreading and phagocytosis. *European journal of immunology* 38, 260-272.
- Terawaki, S., Maesaki, R., and Hakoshima, T. (2006). Structural basis for NHERF recognition by ERM proteins. *Structure* 14, 777-789.
- Thapa, N., and Anderson, R.A. (2012). PIP<sub>2</sub> signaling, an integrator of cell polarity and vesicle trafficking in directionally migrating cells. *Cell adhesion & migration* 6, 409-412.
- Thelin, W.R., Hodson, C.A., and Milgram, S.L. (2005). Beyond the brush border: NHERF4 blazes new NHERF turf. *The Journal of physiology* 567, 13-19.
- Tolias, K.F., Hartwig, J.H., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Cantley, L.C., and Carpenter, C.L. (2000). Type Iα phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Current biology : CB* 10, 153-156.
- Tolias, K.F., Rameh, L.E., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Chen, J., Prestwich, G.D., Cantley, L.C., and Carpenter, C.L. (1998). Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases synthesize the novel lipids phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 5-phosphate. *The Journal of biological chemistry* 273, 18040-18046.
- Tomas, A., Yermen, B., Regazzi, R., Pessin, J.E., and Halban, P.A. (2010). Regulation of insulin secretion by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Traffic* 11, 123-137.

- Tonikian, R., Zhang, Y., Sazinsky, S.L., Currell, B., Yeh, J.H., Reva, B., Held, H.A., Appleton, B.A., Evangelista, M., Wu, Y. (2008). A specificity map for the PDZ domain family. *PLoS biology* 6, e239.
- Tsai, A., and Carstens, R.P. (2006). An optimized protocol for protein purification in cultured mammalian cells using a tandem affinity purification approach. *Nature protocols* 1, 2820-2827.
- Uchida, H., Kondo, A., Yoshimura, Y., Mazaki, Y., and Sabe, H. (2001). PAG3/Papalpa/KIAA0400, a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor (ARF), regulates ARF6 in Fcγ receptor-mediated phagocytosis of macrophages. *The Journal of experimental medicine* 193, 955-966.
- Unbekandt, M., and Olson, M.F. (2014). The actin-myosin regulatory MRCK kinases: regulation, biological functions and associations with human cancer. *Journal of molecular medicine* 92, 217-225.
- van den Bout, I., and Divecha, N. (2009). PIP5K-driven PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> synthesis: regulation and cellular functions. *Journal of cell science* 122, 3837-3850.
- van den Bout, I., Jones, D.R., Shah, Z.H., Halstead, J.R., Keune, W.J., Mohammed, S., D'Santos, C.S., and Divecha, N. (2013). Collaboration of AMPK and PKC to induce phosphorylation of Ser413 on PIP5K1B resulting in decreased kinase activity and reduced PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> synthesis in response to oxidative stress and energy restriction. *The Biochemical journal* 455, 347-358.
- van Hennik, P.B., ten Klooster, J.P., Halstead, J.R., Voermans, C., Anthony, E.C., Divecha, N., and Hordijk, P.L. (2003). The C-terminal domain of Rac1 contains two motifs that control targeting and signaling specificity. *The Journal of biological chemistry* 278, 39166-39175.
- Vicente-Manzanares, M., Rey, M., Jones, D.R., Sancho, D., Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., del Pozo, M.A., Yanez-Mo, M., de Ana, A.M., Martinez, A.C. (1999). Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 α-induced lymphocyte polarization and chemotaxis. *Journal of immunology* 163, 4001-4012.
- Voltz, J.W., Weinman, E.J., and Shenolikar, S. (2001). Expanding the role of NHERF, a PDZ-domain containing protein adapter, to growth regulation. *Oncogene* 20, 6309-6314.
- von Nandelstadh, P., Ismail, M., Gardin, C., Suila, H., Zara, I., Belgrano, A., Valle, G., Carpen, O., and Faulkner, G. (2009). A class III PDZ binding motif in the myotilin and FATZ families binds

enigma family proteins: a common link for Z-disc myopathies. *Molecular and cellular biology* 29, 822-834.

Wang, M., Bond, N.J., Letcher, A.J., Richardson, J.P., Lilley, K.S., Irvine, R.F., and Clarke, J.H. (2010). Genomic tagging reveals a random association of endogenous PtdIns5P 4-kinases I $\alpha$  and I $\beta$  and a partial nuclear localization of the I $\alpha$  isoform. *The Biochemical journal* 430, 215-221.

Wang, S., Raab, R.W., Schatz, P.J., Guggino, W.B., and Li, M. (1998). Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS letters* 427, 103-108.

Weinman, E.J., Minkoff, C., and Shenolikar, S. (2000). Signal complex regulation of renal transport proteins: NHERF and regulation of NHE3 by PKA. *American journal of physiology Renal physiology* 279, F393-399.

Weinman, E.J., Steplock, D., and Shenolikar, S. (1993). CAMP-mediated inhibition of the renal brush border membrane Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger requires a dissociable phosphoprotein cofactor. *The Journal of clinical investigation* 92, 1781-1786.

Weinman, E.J., Steplock, D., Wang, Y., and Shenolikar, S. (1995). Characterization of a protein cofactor that mediates protein kinase A regulation of the renal brush border membrane Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. *The Journal of clinical investigation* 95, 2143-2149.

Wheeler, D., Garrido, J.L., Bisello, A., Kim, Y.K., Friedman, P.A., and Romero, G. (2008). Regulation of parathyroid hormone type 1 receptor dynamics, traffic, and signaling by the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor-1 in rat osteosarcoma ROS 17/2.8 cells. *Molecular endocrinology* 22, 1163-1170.

Whiteford, C.C., Brearley, C.A., and Ulug, E.T. (1997). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate defines a novel PI 3-kinase pathway in resting mouse fibroblasts. *The Biochemical journal* 323 ( Pt 3), 597-601.

Willard, S.S., and Devreotes, P.N. (2006). Signaling pathways mediating chemotaxis in the social amoeba, *Dictyostelium discoideum*. *European journal of cell biology* 85, 897-904.

Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 67, 235-242.

- Wong, H.C., Bourdelas, A., Krauss, A., Lee, H.J., Shao, Y., Wu, D., Mlodzik, M., Shi, D.L., and Zheng, J. (2003). Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Molecular cell* 12, 1251-1260.
- Woods, D.F., and Bryant, P.J. (1993). ZO-1, DlgA and PSD-95/SAP90: homologous proteins in tight, septate and synaptic cell junctions. *Mechanisms of development* 44, 85-89.
- Worthylake, R.A., Lemoine, S., Watson, J.M., and Burridge, K. (2001). RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *The Journal of cell biology* 154, 147-160.
- Wu, Y., Wang, S., Farooq, S.M., Castelvete, M.P., Hou, Y., Gao, J.L., Navarro, J.V., Oupicky, D., Sun, F., and Li, C. (2012). A chemokine receptor CXCR2 macromolecular complex regulates neutrophil functions in inflammatory diseases. *The Journal of biological chemistry* 287, 5744-5755.
- Wurmser, A.E., Gary, J.D., and Emr, S.D. (1999). Phosphoinositide 3-kinases and their FYVE domain-containing effectors as regulators of vacuolar/lysosomal membrane trafficking pathways. *The Journal of biological chemistry* 274, 9129-9132.
- Xia, Y., Irvine, R.F., and Giudici, M.L. (2011). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Iggamma\_v6, a new splice variant found in rodents and humans. *Biochemical and biophysical research communications* 411, 416-420.
- Xiao, F., Weng, J., Fan, K., and Wang, W. (2011). Detailed regulatory mechanism of the interaction between ZO-1 PDZ2 and connexin43 revealed by MD simulations. *PloS one* 6, e21527.
- Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T., and Bourne, H.R. (2003). Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* 114, 201-214.
- Xu, W., Wang, P., Petri, B., Zhang, Y., Tang, W., Sun, L., Kress, H., Mann, T., Shi, Y., Kubes, P. (2010). Integrin-induced PIP5K1C kinase polarization regulates neutrophil polarization, directionality, and in vivo infiltration. *Immunity* 33, 340-350.
- Xu, X.Z., Choudhury, A., Li, X., and Montell, C. (1998). Coordination of an array of signaling proteins through homo- and heteromeric interactions between PDZ domains and target proteins. *The Journal of cell biology* 142, 545-555.

Yamamoto, M., Hilgemann, D.H., Feng, S., Bito, H., Ishihara, H., Shibasaki, Y., and Yin, H.L. (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin stress-fiber formation and inhibits membrane ruffling in CV1 cells. *The Journal of cell biology* 152, 867-876.

Ye, F., and Zhang, M. (2013). Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. *The Biochemical journal* 455, 1-14.

Zhang, X., Loijens, J.C., Boronenkov, I.V., Parker, G.J., Norris, F.A., Chen, J., Thum, O., Prestwich, G.D., Majerus, P.W., and Anderson, R.A. (1997). Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase isozymes catalyze the synthesis of 3-phosphate-containing phosphatidylinositol signaling molecules. *The Journal of biological chemistry* 272, 17756-17761.

Ziemba, B.P., Pilling, C., Calleja, V., Larijani, B., and Falke, J.J. (2013). The PH domain of phosphoinositide-dependent kinase-1 exhibits a novel, phospho-regulated monomer-dimer equilibrium with important implications for kinase domain activation: single-molecule and ensemble studies. *Biochemistry* 52, 4820-4829.

Zimmermann, P., Meerschaert, K., Reekmans, G., Leenaerts, I., Small, J.V., Vandekerckhove, J., David, G., and Gettemans, J. (2002). PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Molecular cell* 9, 1215-1225.

# Anexo





# Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase homo- and heterodimerization determines its membrane localization and activity

Rosa Ana Lacalle,<sup>\*,1</sup> Juan C. de Karam,<sup>\*</sup> Laura Martínez-Muñoz,<sup>\*</sup> Ibai Artetxe,<sup>†</sup> Rosa M. Peregil,<sup>\*</sup> Jesús Sot,<sup>†</sup> Ana M. Rojas,<sup>‡</sup> Félix M. Goñi,<sup>†</sup> Mario Mellado,<sup>\*</sup> and Santos Mañes<sup>\*,1</sup>

<sup>\*</sup>Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Darwin 3, Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain; <sup>†</sup>Unidad de Biofísica Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Campus de Leioa, Barrio Sarriena s/n, Leioa, Bizkaia, Spain; and <sup>‡</sup>Computational Biology and Bioinformatics Group, Instituto de Biomedicina de Sevilla-Hospital Universitario Virgen del Rocío- Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Manuel Siurot s/n, Seville, Spain

**ABSTRACT** Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases (PIP5Ks;  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ) are a family of isoenzymes that produce phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P<sub>2</sub>] using phosphatidylinositol 4-phosphate as substrate. Their structural homology with the class II lipid kinases [type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase (PIP4KII)] suggests that PIP5KI dimerizes, although this has not been formally demonstrated. Neither the hypothetical structural dimerization determinants nor the functional consequences of dimerization have been studied. Here, we used Förster resonance energy transfer, coprecipitation, and ELISA to show that PIP5KI $\beta$  forms homo- and heterodimers with PIP5KI $\gamma$  *in vitro* and in live human cells. Dimerization appears to be a general phenomenon for PIP5KI isoenzymes because PIP5KI $\beta$ /PIP5KI $\alpha$  heterodimers were also detected by mass spectrometry. Dimerization was independent of actin cytoskeleton remodeling and was also observed using purified proteins. Mutagenesis studies of PIP5KI $\beta$  located the dimerization motif at the N terminus, in a region homologous to that implicated in PIP4KII dimerization. PIP5KI $\beta$  mutants whose dimerization was impaired showed a severe decrease in PI(4,5)P<sub>2</sub> production and plasma membrane delocalization, although their association to lipid monolayers was unaltered. Our results identify dimerization as an integral feature of PIP5K proteins and a central determinant of their enzyme activity.—Lacalle, R. A., de Karam, J. C., Martínez-Muñoz, L., Artetxe, I., Peregil, R. M., Sot, J., Rojas, A. M., Goñi, F. M., Mellado, M., and Mañes, S. Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase homo- and heterodimerization determines its membrane

localization and activity. *FASEB J.* 29, 000–000 (2015). [www.fasebj.org](http://www.fasebj.org)

**Key Words:** PIP5K • dimerization • lipid kinase • PI(4,5)P<sub>2</sub>

MANY PROTEINS CAN SELF-ASSOCIATE to form dimers or higher-order oligomers. Dimerization confers structural and functional advantages on proteins, including improved stability and regulatory mechanisms (1). Dimer formation regulates the activity of protein kinases (2), guanosine 5'-triphosphatases (GTPases) (3), and cell receptors of the tyrosine kinase (4) and GPCR families (5).

Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P<sub>2</sub>] is a lipid central to cell signaling. PI(4,5)P<sub>2</sub> modulates cytoskeletal protein conformation and/or activation and also serves as a substrate for PLC or phosphoinositide 3-kinases (6), thus providing distinct lipid mediators. PI(4,5)P<sub>2</sub> levels do not appear to change after cell stimulation (7), suggesting that its synthesis is regulated locally rather than at the whole-cell level (8).

Two enzyme families synthesize PI(4,5)P<sub>2</sub>: the type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases (PIP5Ks), which phosphorylate phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) (9), and type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinases (PIP4KIIs), which phosphorylate phosphatidylinositol 5-phosphate (10). Each enzyme type has 3 isoforms (PIP5KI $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$ ; PIP4KII-A, -B, and -C) as well as several splice variants (11–13). All type I isoenzymes have similar organization, with a highly conserved kinase domain and sequence-divergent N- and C-terminal regions that determine their specific cell localization

Abbreviations:  $\pi_c$ , critical lateral pressure;  $\pi_s$ , saturation pressure; AU, arbitrary units; BSA, bovine serum albumin; CFP, cyan fluorescent protein; co-IP, coimmunoprecipitation; cpm, counts per minute; CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeat; dHL60, DMSO-differentiated HL60; DHPC, 1,2-diheptanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine;

(continued on next page)

<sup>1</sup> Correspondence: Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Darwin 3, Campus de Cantoblanco, Madrid 28049, Spain. E-mail: [rlacalle@cnb.csic.es](mailto:rlacalle@cnb.csic.es) (R.A.L.); [smanes@cnb.csic.es](mailto:smanes@cnb.csic.es) (S.M.)

doi: 10.1096/fj.14-264606

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

and interactions (14). Although isoform-specific binding partners are reported (15–19), only 2 well-defined structural motifs have been identified: that of the talin-binding motif in PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub> (20), and the postsynaptic density protein 95, disc large, zonula occludentes 1 (PDZ)-binding motif at the PIP5KI $\beta$  C terminus (21).

In contrast to the limited structural information available for PIP5KI, all 3 PIP4KII isoenzymes are defined at atomic resolution. Based on its crystal structure, PIP4KII is thought to dimerize through interaction between 2 antiparallel  $\beta$ -sheets at the protein N terminus (22, 23). PIP4KII isoforms are reported to homo- and heterodimerize in cells (24–26), and heterodimerization appears to control PIP4KII enzyme activity (27). Structural modeling studies suggest that PIP5KI can also dimerize (28–30), which could lead to a large, flat, positively charged surface that permits electrostatic interaction with the membrane (30). To our knowledge, PIP5KI dimerization has not been formally demonstrated.

Here, we tested whether PIP5KI $\beta$  forms dimers and the functional role of this dimerization. We show that PIP5KI $\beta$  readily forms homodimers and is able to heterodimerize with other PIP5KI isoforms *in vitro* and in living cells as determined by Förster resonance energy transfer (FRET), coimmunoprecipitation (co-IP), mass spectroscopy, and ELISA studies. Dimer formation was independent of cytoskeletal remodeling and was detected using recombinant proteins, indicating direct interaction between PIP5KI molecules. Site-directed and deletion mutagenesis showed that dimerization is regulated by specific N-terminal PIP5KI residues. The integrity of the dimerization motif determines PIP5KI $\beta$  membrane localization and enzyme activity.

## MATERIALS AND METHODS

### Antibodies and reagents

Anti-PIP5KI $\beta$  (D-19) was from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), anti-4.1 ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein

(continued from previous page)

DOPA, dioleoyl phosphatidic acid; EBP50, 4.1 ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50; EGFP, enhanced green fluorescent protein; ePC, egg phosphatidylcholine; FCS, fetal calf serum; fMLP, *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine; FRET, Förster resonance energy transfer; FRET<sub>50</sub>, half-maximum Förster resonance energy transfer; FRET<sub>max</sub>, maximum Förster resonance energy transfer signal; gRNA, guide RNA; GST, glutathione S-transferase; GTPase, guanosine 5'-triphosphatase; HA, hemagglutinin; HEK, human embryonic kidney; HRP, horseradish peroxidase; IP, immunoprecipitation; MALDI/TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization/time-of-flight; PA, phosphatidic acid; PDB, Protein Data Bank; PDZ, postsynaptic density protein 95, disc large, zonula occludentes 1; PEI, polyethylenimine; PI(4,5)P<sub>2</sub>, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PI4P, phosphatidylinositol 4-phosphate; PIP4KII, type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase; PIP5KI, type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase; Rac, Ras-related C3 botulinum toxin; Rho, Ras homolog gene family; RT, room temperature; sg-ECL, Super-Signal ELISA Pico chemiluminescent substrate; TAP, tandem affinity purification; TBS, Tris-buffered saline; TEV, Tobacco Etch virus; TLC, thin layer chromatography; YFP, yellow fluorescent protein

50 (EBP50) from Affinity Bioreagents (Golden, CO, USA), anti-hemagglutinin (HA) from Covance (Berkeley, CA, USA), horseradish peroxidase (HRP)-labeled anti-mouse and -rabbit IgG from Dako (Glostrup, Denmark), and Cy3- and Cy5-conjugated anti-mouse IgG antibodies from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). Anti-flag, HRP anti-flag, -HA, -tubulin, and -glutathione S-transferase (GST) antibodies, fibronectin, polyethylenimine (PEI), *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), and oligonucleotides were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); human CXCL12 was from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA). Latrunculin B was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Lipids were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

### Cloning and generation of PIP5KI $\beta$ mutants

HA- and enhanced green fluorescent protein (EGFP)-tagged PIP5KI $\beta$ , PIP5KI $\beta$ <sup>K138A</sup>, PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 456, PIP5KI $\beta$ <sup>(-3)D/K</sup>, EGFP-PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub>-flag, HA-EBP50, and HA-talin have been described (16, 21). Cyan fluorescent protein (CFP)- and yellow fluorescent protein (YFP)-tagged PIP5KI $\beta$  and PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub> plasmids were constructed by cloning an AgeI-BsrGI fragment, obtained from the EGFP-tagged plasmid, into pECFP-C1 and pEYFP-C1 (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) with the Rapid DNA ligation kit (Roche, Mannheim, Germany). PIP5KI $\beta$  deletion mutants were generated with the High Expand Fidelity PCR system (Roche) and cloned in pcDNA3-HA to obtain HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 110, HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 232, and HA-PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 318. PIP5KI $\beta$  N terminus mutants were named PIP5KI $\beta$ -L (L35A/Y39A/N43A), PIP5KI $\beta$ -LP (L35A/Y39P/N43A), PIP5KI $\beta$ -F (F64A/L65A/P66A), PIP5KI $\beta$ -LF (L35A/Y39A/N43A/F64A/L65A/P66A), and PIP5KI $\beta$ -LPF (L35A/Y39P/N43A/F64A/L65A/P66A). All were generated by site-directed mutagenesis with the QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA). The PIP5KI $\beta$  N-terminal 110 and 152 amino acids were fused to GST by In-Fusion PCR cloning (Clontech Laboratories), to produce GST-PIP5KI $\beta$ -1-110 and GST-PIP5KI $\beta$ -1-152. The GST-PIP5KI $\beta$ -1-152-LPF mutant was obtained from GST-PIP5KI $\beta$ -1-152 with the QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit. pCDNA3-tandem affinity purification (TAP) was a gift of S. de Lucas (Centro Nacional de Biotecnología/Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain). The tagging cassette has a dual-affinity tag, 2 IgG-binding units of protein A, and a calmodulin-binding peptide, with a Tobacco Etch virus (TEV) protease cleavage site in between. The C-terminal fusion construct PIP5KI $\beta$ -TAP was generated by In-Fusion PCR cloning. PIP5KI $\gamma$ -D235A, kinase-dead, and PIP5KI $\gamma$ -W642F nontalin-binding substitution mutants were obtained from PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub>-flag with the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit. Lck-EGFP was constructed by adding the double palmitoylation signal of p56LCK (12 amino acids) to the EGFP N terminus. This Lck sequence efficiently targets cytosolic proteins to the plasma membrane (31). All clones and mutations were verified by sequencing.

### Cell culture and transfections

HL60 cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with 10% fetal calf serum (FCS) and differentiated with 1.3% DMSO for 7 days. Differentiated cells [DMSO-differentiated HL60 (dHL60)] were transfected with the indicated plasmids by electroporation ( $2 \times 10^7$  cells, 320 mV, 1000  $\mu$ F) in an electroporator (efficiency 15–20%) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA); protein expression was analyzed 4 hours post-transfection by fluorescence-activated cell sorting (Beckman Coulter, Brea, CA,

USA). Human embryonic kidney (HEK)-293 and HEK-293T cells were maintained in DMEM with 10% FCS. Cells were transiently transfected using the calcium phosphate method or the PEI method (transfection efficiency 70–90%), and protein expression was analyzed after 24 hours.

### Cell immunofluorescence and polarity assays

dHL60- or HEK-293T-transfected cells were plated on fibronectin-coated slides, incubated (1 hour at 37°C), then stimulated with  $\alpha$ MLP (100 nM for 5 minutes at 37°C) or CXCL12 (100 nM for 5 minutes at 37°C). Cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde (10 minutes at 20°C) in PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 (10 minutes at 10°C), and incubated with the indicated primary antibody (1 hour at 4°C), followed by Cy3- or Cy5-conjugated secondary antibody. Samples were mounted in VECTASHIELD medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and images recorded in an Olympus IX81 confocal microscope with a PLAPON 60  $\times$  03 objective (aperture 1:40) and FV10-ASW 1.6 software (Olympus, Center Valley, PA, USA). Brightness and/or contrast was adjusted with NIH ImageJ software (Bethesda, MD, USA). There were 8 random fields recorded per condition, and at least 200 cells were counted per sample in 3 independent experiments. For actin polymerization experiments, cells were treated with 10  $\mu$ M latrunculin B (30 minutes) before plating.

### Analysis of PIP5K1 $\beta$ interactions

For pull-down assays, GST-fusion proteins (GST- $\beta$ 1-110, GST- $\beta$ 1-152, and GST- $\beta$ 1-152-LPF) were produced in *Escherichia coli* and purified using glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Mock or HEK-293T cells, transfected as indicated, were stimulated with CXCL12 (100 nM for 5 minutes at 37°C), and extracts were prepared with NP40 buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM EDTA, and protease inhibitors]. Cell extracts were incubated (2 hours at 4°C) with glutathione Sepharose-bound GST proteins or GST, and beads were washed and proteins eluted with sodium dodecyl sulfate sample buffer; proteins were resolved by SDS-PAGE. To visualize GST proteins, nitrocellulose membranes were stained with Ponceau S red or immunoblotted with anti-GST antibody. For immunoprecipitation (IP), serum-starved HEK-293T cells co-expressing EGFP-PIP5K1 $\gamma$  i2-flag or flag-PIP5K1 $\beta$  and HA-PIP5K1 $\beta$ , -PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 110, -PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 232, -PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 318, -PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 456, or -PIP5K1 $\beta$ <sup>(-3)D/K</sup> were stimulated with 100 nM CXCL12 (5 minutes at 37°C), washed with ice-cold PBS, and lysed with NP40 buffer. Cell extracts (400  $\mu$ g) were immunoprecipitated (2 hours at 4°C) with anti-flag or -HA antibody, followed by incubation (1 hour at 4°C) with Protein A/G Plus Sepharose (Santa Cruz Biotechnology). Immunoprecipitates were resolved in SDS-PAGE and analyzed by immunoblot with anti-HA, -flag, or HRP-labeled antibodies. HA-PIP5K1 $\beta$  and PIP5K1 $\gamma$  i2-flag proteins were purified from overexpressed HEK-293T extracts by affinity chromatography. Transfected cells were lysed with NP40 buffer and incubated with anti-HA agarose (Pierce, Rockford, IL, USA) and anti-flag M2 agarose gel (Sigma-Aldrich), respectively (4°C, overnight). After washing with NP40 buffer and Tris-buffered saline (TBS), proteins were eluted with 300  $\mu$ g/ml HA peptide or 100 mM glycine (pH 2.6), respectively. Eluted protein was dialyzed in TBS in a 10,000 Amicon filter device (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). Protein concentration and purity were determined by Coomassie staining. In co-IP assays, 1  $\mu$ g of each purified protein was used.

### Proteomic analyses

PIP5K1 $\beta$ -TAP protein complexes were purified (32). Briefly, NP40 extracts of PIP5K1 $\beta$ -TAP-overexpressing HEK-293T cells

were incubated with IgG Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA); after washing, bound material was released by TEV protease cleavage, and the eluate was captured with calmodulin affinity resin (Agilent Technologies). Protein complexes were eluted in a buffer containing 3 mM EGTA and analyzed by electrophoresis. Proteins from stained SDS-PAGE were excised and identified by matrix-assisted laser desorption/ionization/time-of-flight (MALDI-TOF)/TOF mass spectrometry as described (16). For protein identification, tryptic peptide spectra obtained were searched against the Swiss-Prot database using a licensed version 2.3.02 of Mascot (Matrix Science, London, United Kingdom) as search engine.

### ELISAs

HA- or flag-protein expression in cell extracts was determined by direct ELISA. HEK-293T cells were transfected with HA-PIP5K1 $\beta$ , HA-PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 456, flag-PIP5K1 $\beta$ , all N-terminal region mutants, or PIP5K1 $\gamma$  i2-flag, and cell extracts were prepared in NP40 buffer. Microplates were coated with cell extracts, blocked with bovine serum albumin (BSA), incubated with anti-HA-HRP or -flag-HRP antibody, and developed with Super-Signal ELISA Pico chemiluminescent substrate (sg-ECL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Values in the linear range were used to calculate concentrations (in a typical experiment): 5–13.10<sup>6</sup> arbitrary units (AU)/ $\mu$ l for HA-PIP5K1 $\beta$ , HA-PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 456, and flag-PIP5K1 $\beta$ , and 9–13.10<sup>7</sup> AU/ $\mu$ l for PIP5K1 $\gamma$  i2.

A sandwich ELISA was designed to measure dimer formation. High-binding white 96-well microplates were coated with anti-HA antibody (1  $\mu$ g/ml; 100  $\mu$ l/well) in coating buffer [100 mM carbonate buffer (pH 9.4); 4°C, overnight]. Plates were blocked with 2% BSA (2 hours), and cell extracts expressing HA-tagged proteins were added and incubated [2 hours at room temperature (RT)]. Plates were washed, and cell extracts expressing the flag-tagged fusion protein were added and incubated (2 hour at RT). After washing plates, anti-flag-HRP antibody was added (1:2000; 100  $\mu$ l/well) and incubated (1 hour at RT); plates were washed 4 times (300  $\mu$ l/well in PBS containing 0.05% Triton-X-100) between each step in a Multiwash III Microplate Washer (TriContinent Scientific, Incorporated, Grass Valley, CA, USA). The ELISA was developed with sg-ECL, and light emission was measured in an Infinite M200 luminometer microplate reader (Tecan, Salzburg, Austria). Luminescent values are expressed in AU as the mean  $\pm$  SEM of triplicate samples ( $n=3$ ). Binding curves were generated with serial dilutions of HA-tagged extracts (start point 10<sup>8</sup> AU per well) and a constant 10<sup>9</sup> AU per well of flag-labeled extracts. In competitive ELISA, purified GST-fusion proteins were incubated with flag protein-expressing cell extracts (20  $\mu$ l extract per well  $\sim$ 10<sup>8</sup> AU) (1 hour at 4°C) before addition to the microplate. GST-fusion proteins were purified as above and eluted with 15 mM reduced glutathione; protein concentration was determined by Coomassie-stained SDS-PAGE. Values are expressed in AU as the mean  $\pm$  SEM of triplicates ( $n=3$ ).

### FRET analyses

For FRET saturation curves, HEK-293T cells were cotransfected with plasmids encoding the CFP and/or YFP fusion proteins of PIP5K1 $\beta$  and PIP5K1 $\gamma$  i2, as described (33). As a negative control, FRET was determined in CFP-PIP5K1 $\beta$  or CFP-PIP5K1 $\gamma$  transfected with VCAM-YFP (34). To determine half-maximum FRET (FRET<sub>50</sub>) and maximum FRET signal (FRET<sub>max</sub>), values were extrapolated from data analysis using a nonlinear regression equation applied to a single binding site model with a 95% confidence interval (Prism 5.0; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). All FRET determinations include at least 5 independent

experiments. To determine the influence of HA-EBP50 or HA-talin expression on homo- and heterodimers, we cotransfected HEK-293T cells with HA empty vector (control) or HA-EBP50 or HA-talin and CFP-PIP5K1 $\beta$ /YFP-PIP5K1 $\beta$ , CFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub>/YFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub>, or CFP-PIP5K1 $\beta$ /YFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub>. Curves in these groups (PIP5K1 $\beta$  homodimer/HA and PIP5K1 $\beta$  homodimer/HA-EBP50; PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> homodimer/HA and PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> homodimer/HA-talin; and PIP5K1 $\beta$ / $\gamma$ <sub>i2</sub> heterodimer/HA and PIP5K1 $\beta$ / $\gamma$ <sub>i2</sub> heterodimer/HA-EBP50 or HA-talin) were paired, and dimerization was evaluated. To determine which model best fit the data for the 4 pairs of saturation curves ( $n = 5$ ), we used Akaike information criterion corrected for small sample size (35). We used Prism 5.0 software.

FRET was measured by acceptor photobleaching in dHL60 cells transiently electroporated with 20  $\mu$ g CFP-PIP5K1 $\beta$  and 20  $\mu$ g YFP-PIP5K1 $\beta$ , with 20  $\mu$ g CFP-PIP5K1 $\beta$  and 10  $\mu$ g YFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub>, or with 20  $\mu$ g CFP-PIP5K1 $\beta$  and 5  $\mu$ g VCAM-YFP constructs to ensure a 3:1 YFP:CFP ratio in which receptor pairs reach maximum FRET efficiency in each case (34). At 4 hours post-transfection, cells ( $10^5$  per well) were plated in fibronectin-coated slide chambers (30 minutes), stimulated with 100 nM  $\mu$ MLP, fixed, and mounted in a medium without antifading agents. Images were acquired on the Olympus IX81 microscope. As a negative control, FRET was determined in CFP-PIP5K1 $\beta$  transfected with VCAM-YFP. FRET efficiency was calculated from at least 30 images each from 4 independent experiments.

### Structural modeling

We conducted multiple sequence alignments of the proteins to test overall conservation using MAFFT (36) in its slow and accurate version. The structure of PIP4KII $\beta$  [UniProt P78356; Protein Data Bank (PDB) 1BO1] was used to analyze the dimerization interface at structural level to identify dimerization-relevant residues and to compare PIP5K1 $\alpha$ , PIP5K1 $\beta$ , and PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> homology-structural models in the Protein Model Portal (<http://www.proteinmodelportal.org>).

### Surface pressure measurements

Langmuir lipid monolayers at the air-water interface were used as a model membrane system to study lipid-protein interaction. HA-PIP5K1 $\beta$  and HA-PIP5K1 $\beta$ -LPF proteins were purified from over-expressed HEK-293T extracts, as described above, except extracts were prepared in 1,2-diheptanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DHPC) lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM DHPC, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, and protease inhibitors].

Surface pressure experiments were carried out with a Micro-Trough Ssystem (Kibron, Helsinki, Finland) at 25°C, with constant stirring. The aqueous phase consisted of 1 ml of 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 8.0). Lipids dissolved in chloroform:methanol (2:1), egg phosphatidylcholine (ePC), PI4P, and dioleoyl phosphatidic acid (DOPA) were spread gently over the surface until the desired initial surface pressure was attained. The purified protein was injected with a micropipette through a hole connected to the subphase. The increment in surface pressure was recorded until a stable signal was obtained. The plots show 1 of 2 closely similar independent measurements. Values of critical lateral pressure ( $\pi_c$ ) were determined by linear regression using the values over the saturation pressure ( $\pi_s$ ).  $\pi_c$  is expressed in millinewton per meter as the mean  $\pm$  SEM.

### Lipid kinase assay

Lipid kinase activity was determined as described (16). HA-PIP5K1 $\beta$ , HA-PIP5K1 $\beta$ -L, and HA-PIP5K1 $\beta$ -LPF-purified proteins

and HA-tagged enzymes immunoprecipitated from HEK-293 cell extracts were used for the kinase assay. The kinase reaction mix (50  $\mu$ l) contained 50 mM Tris (pH 7.5), 200  $\mu$ M PI4P, 20  $\mu$ M ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (Taper, Madrid, Spain). After 3 acid extractions, Cerenkov radioactivity was measured in samples [counts per minute (cpm)] before thin layer chromatography (TLC) loading (28). Radioactive spots with an retardation factor value corresponding to PI(4,5)P<sub>2</sub> were identified by autoradiography after TLC developing in chloroform:methanol:acetic acid:H<sub>2</sub>O (10:10:1:3).

### Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9 knockout of human PIP5K1 $\beta$

Guide RNAs (gRNAs) for human PIP5K1 $\beta$  were selected with the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) design tool (37) (<http://crispr.mit.edu>) to target the 5' end of the protein coding region. There were 3 gRNAs with the highest scores selected: exon 664–791, 5'-TGCATAAGAACATCTCGTTCTGG-3' (gRNA1, score 87); exon 910–1062, 5'-GGGTTAGACAGTTCTATTAGAGG-3' (gRNA2, score 85); and exon 1063–1362, 5'-GGACTGTATTGTATGCAATCAGG-3' (gRNA3, score 83). A pair of annealed oligonucleotides for each gRNA were cloned in BsmBI-digested pLenti-CRISPRv1 (38) (Addgene, Cambridge, MA, USA). Lentivirus was produced by transfecting HEK-293T with pLenti-CRISPR, psPAX2, and pVSVG using a standard calcium phosphate protocol. HEK-293T cells were transduced with the empty vector (mock-transduced cells) or each of the gRNAs, and puromycin-resistant individual clones were isolated and grown. For indel analysis, genomic DNA was prepared with the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and used as template for PCR amplification of the region near the Cas9 cleavage site. The primers (forward/reverse) used were gRNA1, 5'-AGGTGCTATT-CAGCTGGGAA-3'/5'-AGGAACACACTTCCACCACA-3'; gRNA2, 5'-TTCCATCTGCAGTGAACCTCT-3'/5'-AGCTTCTTTGTGCTG-AACTGT-3'; and gRNA3, 5'-ATCCAAGGACTCTTTTGCCA-3'/5'-AGTGCATTCTCATGGAGCGT-3'. PCR products were gel extracted and analyzed by sequencing.

### Statistical analysis

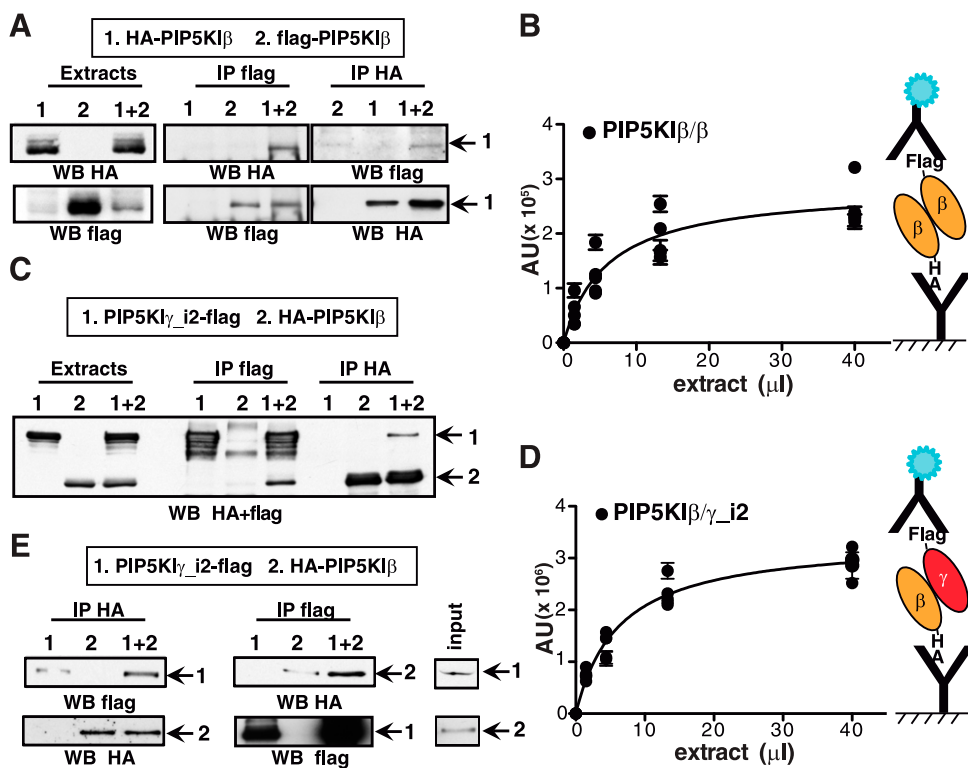
Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Dunnett's 2-tailed or Student's 2-tailed *t* tests were used to compare differences between groups in various experiments.

## RESULTS

### PIP5K1 $\beta$ forms homodimers

Based on their similarity to PIP4KII, PIP5K1s are assumed to dimerize. To formally demonstrate that PIP5K1 $\beta$  forms dimers, we immunoprecipitated HA- or flag-tagged PIP5K1 $\beta$  from HEK-293T cells that expressed one or both of these proteins. Anti-flag and -HA antibodies coimmunoprecipitated HA- or flag-PIP5K1 $\beta$ , respectively, only in cells that coexpressed both proteins (Fig. 1A).

For a complementary approach to analysis of PIP5K1 $\beta$  dimerization, we designed a sandwich-type ELISA in which HA-PIP5K1 $\beta$  from cell extracts was trapped with an anti-HA antibody; binding of flag-PIP5K1 $\beta$ , added in the soluble phase, was detected with anti-flag antibody. Flag-PIP5K1 $\beta$  bound specifically to HA-PIP5K1 $\beta$  in a dose-dependent saturation curve (Fig. 1B). These results suggest the ability of PIP5K1 $\beta$  to homodimerize.



tion was analyzed by ELISA as in (B). E) Equal amounts of affinity-purified PIP5KIγ<sub>i2</sub> (1) or PIP5KIβ (2) or a mixture of both (1+2) was precipitated with anti-HA or -flag antibodies. Representative experiments are shown (*n* = 3).

### PIP5KIβ heterodimerizes with other PIP5KI isoforms

To test whether PIP5KI isoforms can heterodimerize, we immunoprecipitated extracts from cells overexpressing HA-PIP5KIβ and flag-tagged-PIP5KIγ<sub>i2</sub> isoforms (also known as PIP5KIγ661 and PIP5KIγ90, respectively) (20). Anti-flag antibody coimmunoprecipitated HA-PIP5KIβ and PIP5KIγ<sub>i2</sub>-flag in cells that overexpressed both isoforms; likewise, HA-PIP5KIβ and PIP5KIγ<sub>i2</sub>-flag were coimmunoprecipitated by the anti-HA antibody (Fig. 1C). HA-PIP5KIβ and PIP5KIγ<sub>i2</sub>-flag also interacted in a dose-dependent manner in the ELISA sandwich assay (Fig. 1D), suggesting that these PIP5KI isoforms form heterodimers.

To determine whether these PIP5KI isoforms interact directly, we purified HA-PIP5KIβ and PIP5KIγ<sub>i2</sub>-flag produced in HEK-293T cells by affinity chromatography (Supplemental Fig. S1A, B) and found coprecipitation of recombinant HA-PIP5KIβ and PIP5KIγ<sub>i2</sub>-flag using anti-HA or -flag antibodies (Fig. 1E). These results indicate that PIP5KIβ and PIP5KIγ<sub>i2</sub> interact in the absence of other cell components.

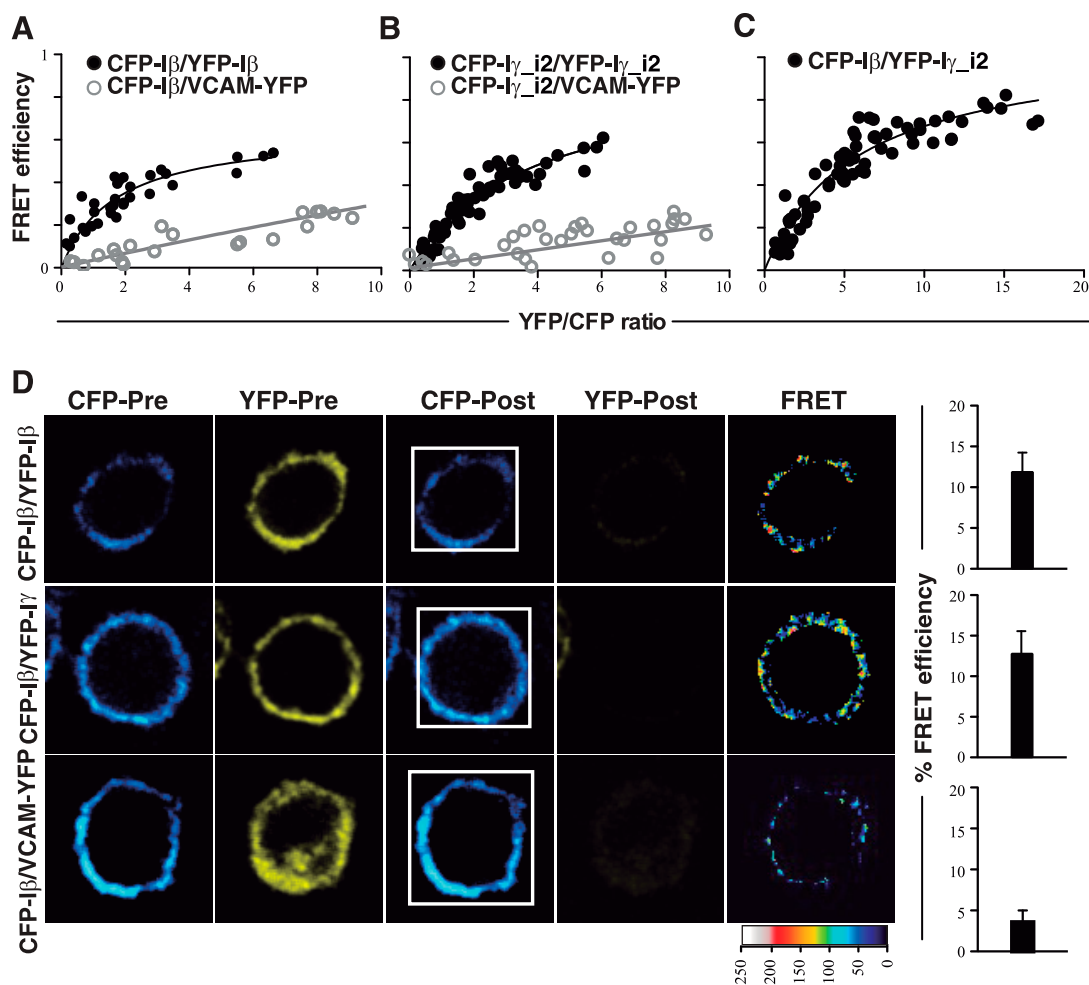
To analyze whether PIP5KIβ interacts with other PIP5KI isoforms, we used TAP from protein A-calmodulin-PIP5KIβ-overexpressing HEK-293T cell extracts. MALDI/TOF mass spectrometric analysis of proteins bound to purified PIP5KIβ identified endogenous PIP5KIα and PIP5KIγ (Supplemental Fig. S1C). The data indicate that not only overexpressed proteins but also endogenous PIP5KI interact with PIP5KIβ.

### PIP5KIβ and PIP5KIγ<sub>i2</sub> form homo- and heterodimers in living cells

To study homo- and heterodimerization in live cells, we generated FRET saturation curves using HEK-293T cells transiently cotransfected with constant amounts of donor CFP-PIP5KIβ or -γ<sub>i2</sub> and an increasing amount of acceptor YFP-PIP5KIβ or -γ<sub>i2</sub>. FRET was positive for PIP5KIβ (Fig. 2A) and PIP5KIγ<sub>i2</sub> homodimers (Fig. 2B), as well as for CFP-PIP5KIβ/YFP-PIP5KIγ<sub>i2</sub> heterodimers (Fig. 2C). The FRET<sub>max</sub> differed among the complexes (PIP5KIβ/β, 0.648 ± 0.06; PIP5KIγ<sub>i2</sub>/γ<sub>i2</sub>, 0.947 ± 0.08; and PIP5KIβ/γ<sub>i2</sub>, 1.069 ± 0.06). The amount of protein needed to achieve FRET<sub>50</sub> likewise differed for the distinct complexes (PIP5KIβ/β, 1.695 ± 0.39; PIP5KIγ<sub>i2</sub>/γ<sub>i2</sub>, 3.656 ± 0.57; and PIP5KIβ/γ<sub>i2</sub>, 5.801 ± 0.73). In accordance with bioluminescence resonance energy transfer experiments (39), FRET<sub>50</sub> could indicate the apparent affinity between proteins; in this case, because the partners differed between complexes, the results cannot be compared. Controls showed no energy transfer for CFP-PIP5KIβ or for CFP-PIP5KIγ<sub>i2</sub> with the membrane-anchored chimeric protein VCAM-YFP (Fig. 2A, B) or the cytosolic protein YFP (data not shown), indicating specificity of the interaction between the kinases. The data also indicated that FRET<sub>max</sub> is detected in cells at distinct YFP:CFP ratios, depending on the proteins analyzed.

We used acceptor photobleaching FRET to analyze PIP5KIβ homo- and heterodimer location in dHL60 cells and to confirm FRET saturation curves. We transiently cotransfected dHL60 cells with CFP-PIP5KIβ/YFP-PIP5KIβ or CFP-PIP5KIβ/YFP-PIP5KIγ<sub>i2</sub>. All FRET determinations





**Figure 2.** PIP5K1 $\beta$  forms homo- and heterodimers in living cells. FRET analyses of PIP5K1 $\beta$  homodimers (A), PIP5K1 $\gamma_{i2}$  homodimers (B), and CFP-PIP5K1 $\beta$ /YFP-PIP5K1 $\gamma_{i2}$  heterodimers (C). FRET saturation curves generated using HEK-293T cells transiently cotransfected with a constant amount of CFP-protein and increasing amounts of YFP-protein. As negative controls, we used CFP-PIP5K1 $\beta$ /VCAM-YFP (A) and CFP-PIP5K1 $\gamma_{i2}$ /VCAM-YFP (B). FRET<sub>50</sub> and FRET<sub>max</sub> values were calculated (see Materials and Methods; mean  $\pm$  SEM). D) FRET analysis of PIP5K1 $\beta$  homodimer and PIP5K1 $\beta$ / $\gamma_{i2}$  heterodimer by acceptor photobleaching in dHL60 cells. Representative images before (CFP-Pre and YFP-Pre) and after (CFP-Post and YFP-Post) photobleaching, with a FRET image at the photobleached areas using a false-color scale, are shown. Areas for bleaching analysis (white outline) are indicated. As a negative control, FRET was analyzed for CFP-PIP5K1 $\beta$ /VCAM-YFP. Mean percent (%) FRET efficiency  $\pm$  SEM is shown.

were done with cells that expressed a 4:1 YFP:CFP ratio. Fluorescent proteins localized at the cell surface, and we detected positive FRET and similar FRET efficiency values for PIP5K1 $\beta$  homo- and heterodimers (Fig. 2D). No energy transfer was observed for CFP-PIP5K1 $\beta$ /VCAM-YFP (Fig. 2D) or YFP (data not shown) in controls. PIP5K1 $\beta$  and PIP5K1 $\gamma_{i2}$  colocalize at the uropod in polarized dHL60 cells (16, 21); here, we were unable to determine whether PIP5K1 $\beta$ / $\gamma_{i2}$  heterodimers formed preferentially at the uropod because FRET measurements were unreliable due to low pixel number in the region of interest or fluorescence saturation caused by protein accumulation. Our data nonetheless indicate that PIP5K1 $\beta$  and PIP5K1 $\gamma_{i2}$  form homo- and heterodimers at the plasma membrane.

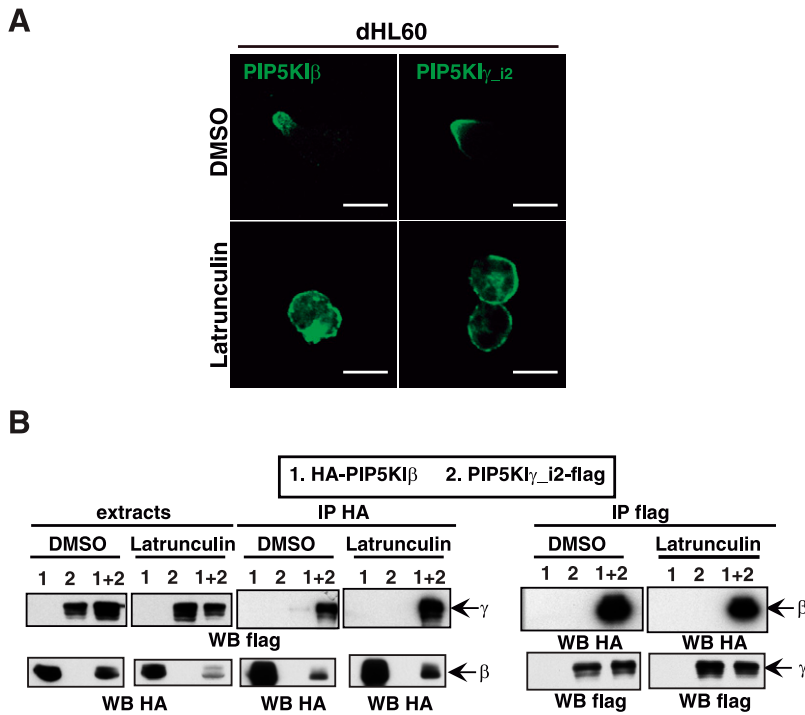
#### PIP5K1 $\beta$ / $\gamma_{i2}$ heterodimerization does not require actin polymerization

To study the role of the actin cytoskeleton in PIP5K1 homo- and heterodimerization, we treated dHL60 or

HEK-293T cells with latrunculin B, an actin polymerization inhibitor. Latrunculin did not affect PIP5K1 $\beta$  or PIP5K1 $\gamma_{i2}$  association to the plasma membrane, although it abolished  $\mu$ LP-induced polarization of these kinases at the dHL60 cell uropod (Fig. 3A), indicating drug activity. IP assays showed that PIP5K1 $\beta$ / $\gamma_{i2}$  heterodimer formation was unaffected by latrunculin treatment in HEK-293T cells (Fig. 3B), suggesting that dimer formation is intrinsic to these kinases and independent of aggregation induced by actin rearrangement.

#### Homo- and heterodimers are unaffected by PIP5K1 $\beta$ / $\gamma_{i2}$ C-terminal-binding proteins

The C termini of PIP5K1 $\beta$  and PIP5K1 $\gamma_{i2}$  bear the respective binding motifs for EBP50 (16, 21) and talin (15, 20, 40). We tested whether EBP50 or talin binding modulated PIP5K1 $\beta$  or PIP5K1 $\gamma_{i2}$  dimer conformation. HEK-293T cells were cotransfected with HA-EBP50, HA-talin,



**Figure 3.** PIP5K1 $\beta$  and PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> dimer formation is independent of F-actin polymerization. *A*) Latrunculin treatment abrogates PIP5K1 $\beta$  or PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> uropod localization in dHL60 cells. EGFP-PIP5K1 $\beta$ - or EGFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub>-expressing dHL60 cells were treated with latrunculin B (10  $\mu$ M), adhered to fibronectin-coated slides, stimulated, fixed, and visualized by confocal microscopy. Scale bars, 10  $\mu$ m. *B*) HEK-293T cells overexpressing PIP5K1 $\beta$  (1) and/or PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> (2) were treated with vehicle (DMSO) or latrunculin B. Equal amounts of protein extracts were coimmunoprecipitated with anti-HA and -flag, and bands were visualized with anti-HA-HRP and -flag-HRP in Western blot. Overexpressed proteins in lysates were analyzed with the same antibodies.

or an empty vector, with constant amounts of CFP-PIP5K1 $\beta$  or CFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> and with increasing amounts of YFP-PIP5K1 $\beta$  or YFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub>. HA-EBP50 and HA-talin overexpression was constant (data not shown) and caused no variation in donor/acceptor fluorescence (Table 1). FRET<sub>50</sub> and FRET<sub>max</sub> values for PIP5K1 $\beta$ / $\beta$  and PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub>/ $\gamma$ <sub>i2</sub> homodimers and for PIP5K1 $\beta$ / $\gamma$  heterodimers were not altered by EBP50 or talin expression (Fig. 4A–D). The data suggest that PIP5K1 C-terminal-binding partners do not affect apparent dimer affinity or number.

This finding was reinforced by coprecipitation of PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub>-flag with HA-PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 456 (Fig. 4E), a mutant that lacks the 83 terminal amino acids (16), or HA-PIP5K1 $\beta$ <sup>(-3)DK</sup> (Fig. 4F), which has a nonfunctional PDZ-binding motif (21). Co-IP experiments also showed that PIP5K1 $\beta$  can dimerize with PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> kinase-dead (PIP5K1 $\gamma$ D235A) or PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> talin-binding (PIP5K1 $\gamma$ W642F) mutants (Fig. 4G), which indicated the dimerization independence of the talin-binding domain and the kinase

activity of PIP5K1 $\gamma$ . These data support the idea that dimerization is an intrinsic characteristic of PIP5K1.

### The PIP5K1 $\beta$ N-terminal region is sufficient for dimerization

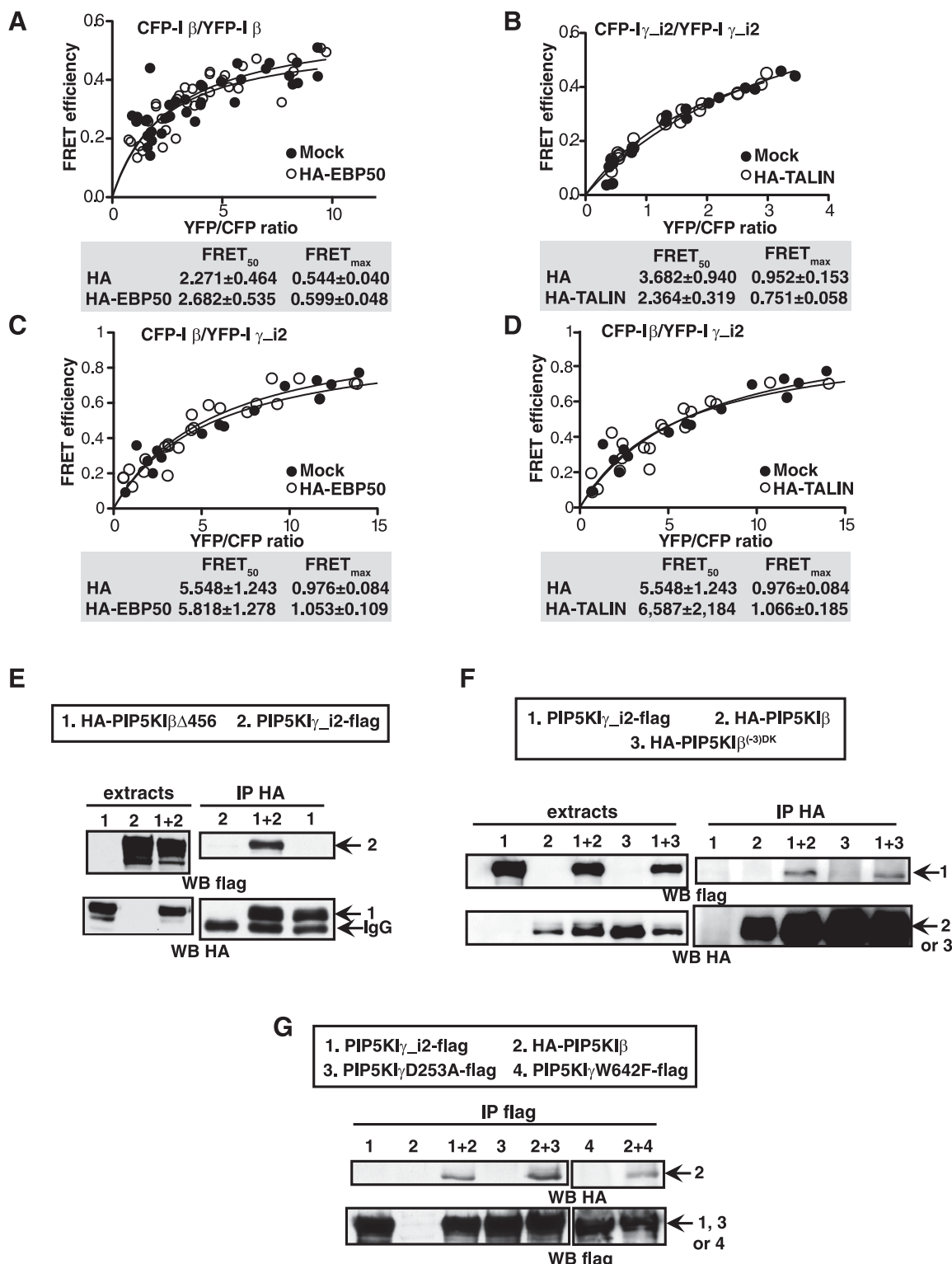
To identify the PIP5K1 $\beta$  dimerization domain, we generated a series of C-terminally truncated PIP5K1 $\beta$  mutants (Fig. 5A) that were cotransfected with full-length PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub>-flag in HEK-293T cells. PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> interacted with PIP5K1 $\beta$ , PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 328, PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 232, and PIP5K1 $\beta$  $\Delta$ 110 mutants (Fig. 5B). Co-IP results were similar for full-length flag- and HA-PIP5K1 $\beta$  mutants (Supplemental Fig. S2A). These results indicate that the 110 N-terminal amino acids of PIP5K1 $\beta$  are involved in dimerization.

This conclusion was supported by pull-down assays. Because the PIP5K1 $\beta$ -1-110 fragment was insoluble in *E. coli* (data not shown), we generated a GST-fusion

TABLE 1. Cotransfection of binding partners does not alter PIP5K1 expression

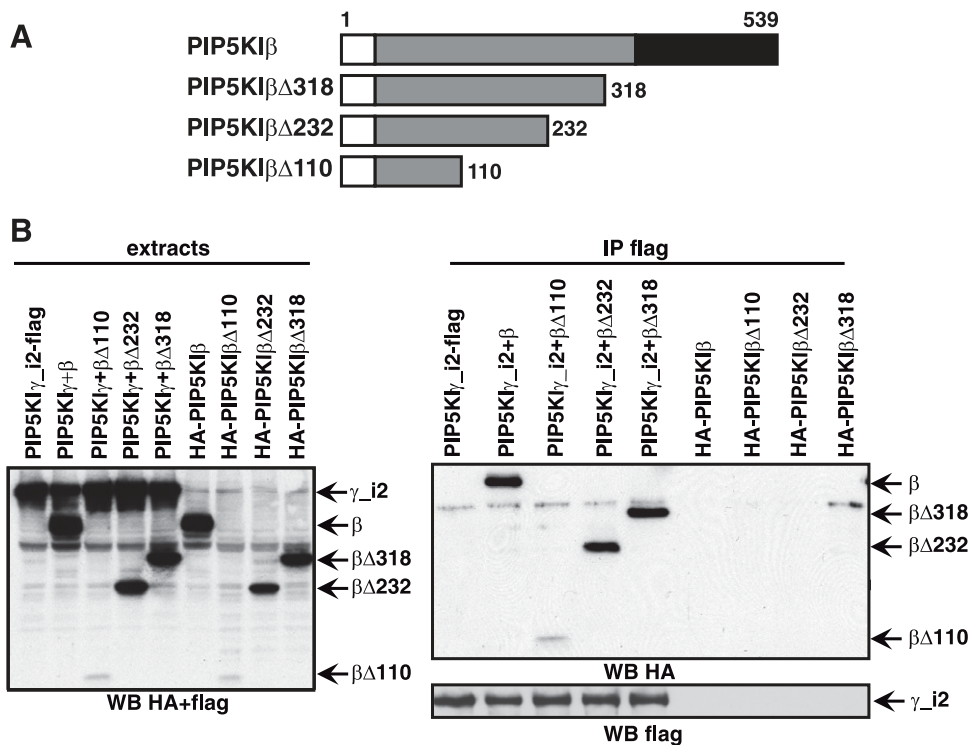
Plasmid	CFP intensity (FU)	YFP intensity (FU)
CFP-PIP5K1 $\beta$ /YFP-PIP5K1 $\beta$ + HA	CFP-PIP5K1 $\beta$ (2 $\mu$ g) 150,038 $\pm$ 63,264	YFP-PIP5K1 $\beta$ ~200,000–1.2 million
CFP-PIP5K1 $\beta$ /YFP-PIP5K1 $\beta$ + HA-EBP50	216,540 $\pm$ 84,447	~200,000–1.2 million
CFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> /YFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> + HA	CFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> (2 $\mu$ g) 213,098 $\pm$ 86,879	YFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> ~160,000–1.5 million
CFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> /YFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> + HA-talin	285,837 $\pm$ 126,931	~220,000–1.4 million
CFP-PIP5K1 $\beta$ /YFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> + HA	CFP-PIP5K1 $\beta$ (2 $\mu$ g) 112,218 $\pm$ 68,714	YFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> ~100,000–1.4 million
CFP-PIP5K1 $\beta$ /YFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> + HA-EBP50	146,207 $\pm$ 77,498	~100,000–1.5 million
CFP-PIP5K1 $\beta$ /YFP-PIP5K1 $\gamma$ <sub>i2</sub> + HA-talin	117,025 $\pm$ 61,774	~90,000–1.5 million

CFP-PIP5K1 ( $\beta$  or  $\gamma$ <sub>i2</sub>) and YFP-PIP5K1 ( $\beta$  or  $\gamma$ <sub>i2</sub>) fluorescence in HEK-293T cells cotransfected with empty plasmid (HA), HA-EBP50, or -talin constructs is shown. Values show the mean  $\pm$  SEM fluorescence of donor (CFP) and acceptor (YFP) proteins. FU, fluorescence units.



**Figure 4.** The C terminus is not involved in PIP5K $\beta$  dimerization. FRET saturation curves using HEK-293T cells cotransfected with (A) CFP-PIP5K $\beta$ , YFP-PIP5K $\beta$ , mock (control), or HA-EBP50, (B) CFP-PIP5K $\gamma_{i2}$ , YFP-PIP5K $\gamma_{i2}$ , mock (control), or HA-talin, (C) CFP-PIP5K $\beta$ , YFP-PIP5K $\gamma_{i2}$ , mock, or HA-EBP50, and (D) CFP-PIP5K $\beta$ , YFP-PIP5K $\gamma_{i2}$ , mock, or HA-talin are shown. FRET<sub>50</sub> and FRET<sub>max</sub> values are shown (mean  $\pm$  SEM). One representative experiment is shown ( $n = 5$ ). E and F Extracts from HEK-293T cells expressing PIP5K $\gamma_{i2}$ -flag, alone, or coexpressed with HA-tagged PIP5K $\beta\Delta 456$  (E), or PIP5K $\beta$  or PIP5K $\beta^{(-3)DK}$  (F) were immunoprecipitated with anti-HA antibody. Blots were developed with anti-HA and -flag antibodies to visualize coimmunoprecipitated proteins; overexpressed proteins in cell extracts are shown (left). G The flag-tagged PIP5K $\gamma_{i2}$  (positive control), -PIP5K $\gamma_{i2}$ D253A (kinase-dead mutant), and -PIP5K $\gamma_{i2}$ W642F (talin-binding mutant) were coexpressed with HA-PIP5K $\beta$  and immunoprecipitated with anti-flag antibody. Proteins were detected in Western blot with anti-HA and -flag antibodies. In (E)–(G), one representative experiment is shown ( $n = 3$ ).





**Figure 5.** The PIP5KI $\beta$  N-terminal region is sufficient for dimerization. **A)** Scheme showing PIP5KI $\beta$  deletion mutants used. Kinase domain (gray), N terminus (white), and C terminus (black) are indicated. **B)** Lysates from cells coexpressing PIP5KI $\gamma_i2$ -flag and wild-type or truncated HA-PIP5KI $\beta$  were coimmunoprecipitated with anti-flag antibody. Resolved proteins were blotted with anti-HA and flag antibodies. HA- and flag-protein expression in extracts is shown. One representative experiment is shown ( $n = 4$ ).

protein that included the first 152 amino acids (GST-PIP5KI $\beta$ -1-152), which we used as bait to screen the interaction with extracts from HEK-293T cells expressing the C-terminal PIP5KI $\beta$  deletion mutants. These assays showed GST-PIP5KI $\beta$ -1-152 interaction with full-length PIP5KI $\beta$  and PIP5KI $\gamma_i2$  isoforms, as well as with PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 456, PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 328, and PIP5KI $\beta$  $\Delta$ 232 mutants (Supplemental Fig. S2B). It therefore appears that the PIP5KI $\beta$  N-terminal region contains structural motifs sufficient for dimerization.

### Identification of critical N-terminal residues for PIP5KI $\beta$ dimerization

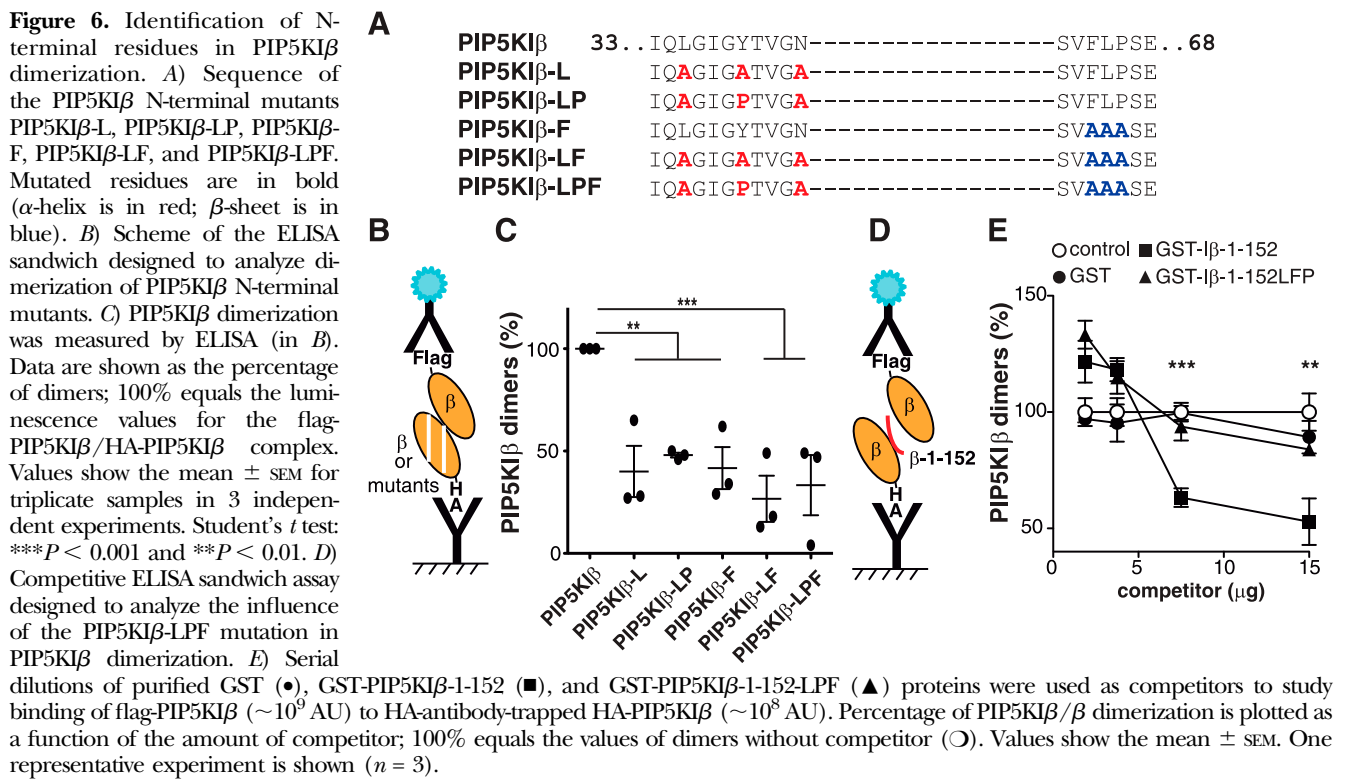
PIP4KII dimerizes through an N-terminal clasp-like interface of  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -strands (22, 23). Multiple alignments of the N-terminal sequences from mouse and human PIP4KII $\beta$  and the 3 PIP5KI isoforms (Supplemental Fig. S3A) showed that the predicted  $\alpha$ -helix region is well conserved in PIP5KI, but the  $\beta$ -sheet is not. Structural analysis of PIP4KII $\beta$  (PDB 1BO1) indicated that the  $\beta$ -sheet interchain interactions were very strong because most residues that interacted with the other molecule were recovered within 4 Å;  $\alpha$ -helix interactions involved bulky, charged residues (Supplemental Fig. S3B). Analysis of protein models (<http://www.proteinmodelportal.org>) for the 3 PIP5KI isoforms using PIP4KII $\beta$  as template showed that the  $\alpha$ -helix was conserved in PIP5KI and PIP4KII $\beta$  in both sequence alignment and structural modeling; in contrast, the PIP4KII $\beta$   $\beta$ -sheet was not found in PIP5KI. Lack of conservation does not preclude interaction because the  $\beta$ -sheet might be formed after the interaction of N-terminal regions. Indeed, the equivalent PIP5KI region

has a stretch of aromatic residues (Phe-Leu/Phe-Pro; Supplemental Fig. S3A) that could be involved in post-dimerization stacking events.

For functional analysis of these motifs in PIP5KI $\beta$  dimerization, we mutated Leu35, Tyr39, and Asn43 (critical for  $\alpha$ -helix formation), alone or combined with Phe64-Leu65-Pro66 (possibly involved in  $\beta$ -sheet conformation); all were replaced by Ala to avoid lateral contact between helices or to eliminate packaging of aromatic residues. To confirm complete disruption of  $\alpha$ -helix structure, we also generated equivalent mutants in which Tyr39 was replaced by Pro (Fig. 6A). The EBP50 interaction of these mutants was preserved (Supplemental Fig. S3C, D), indicating that mutations at the N-terminal  $\alpha$ -helix and/or  $\beta$ -sheet did not lead to general misfolding of PIPKI $\beta$ .

To test the ability of these mutants to form dimers with PIP5KI $\beta$ , we used a sandwich ELISA in which flag-PIP5KI $\beta$  was added to HA-tagged mutants bound to a plate by anti-HA antibody (Fig. 6B); plate-bound HA-PIP5KI $\beta$  served as a positive control. All the PIP5KI $\beta$  mutants showed significantly decreased binding to PIP5KI $\beta$  compared to wild-type kinase (Fig. 6C), suggesting that the N-terminal  $\alpha$ -helix and the region homologous to the  $\beta$ -sheet of PIP4KII are needed for dimer formation. The mutants showed no notable differences in their binding to PIP5KI $\beta$ , suggesting that  $\alpha$ -helix or  $\beta$ -sheet disruption was sufficient to impair dimerization.

To confirm the importance of the N-terminal region in dimer formation, we designed a competitive ELISA in which plate-bound HA-PIP5KI $\beta$  was pre-incubated with varying amounts of GST-PIP5KI $\beta$ -1-152, or a version of this fragment with mutated  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet residues (GST-PIP5KI $\beta$ -1-152-LPF; Supplemental Fig. S3E). Flag-PIP5KI $\beta$



was then added and binding determined with anti-flag antibodies (Fig. 6D). Vehicle and GST were used as controls. GST-PIP5K1 $\beta$ -1-152, but not GST-PIP5K1 $\beta$ -1-152-LPF, competed for formation of PIP5K1 $\beta$ / $\beta$  dimers in a dose-dependent manner (Fig. 6E), suggesting that GST-PIP5K1 $\beta$ -1-152-LPF lost the capacity to bind HA-PIP5K1 $\beta$  and thus to compete for flag-PIP5K1 $\beta$  binding. These data identify specific N-terminal residues necessary for PIP5K1 $\beta$  dimerization.

#### Dimerization controls PIP5K1 $\beta$ cell localization, but not its association to lipid monolayers

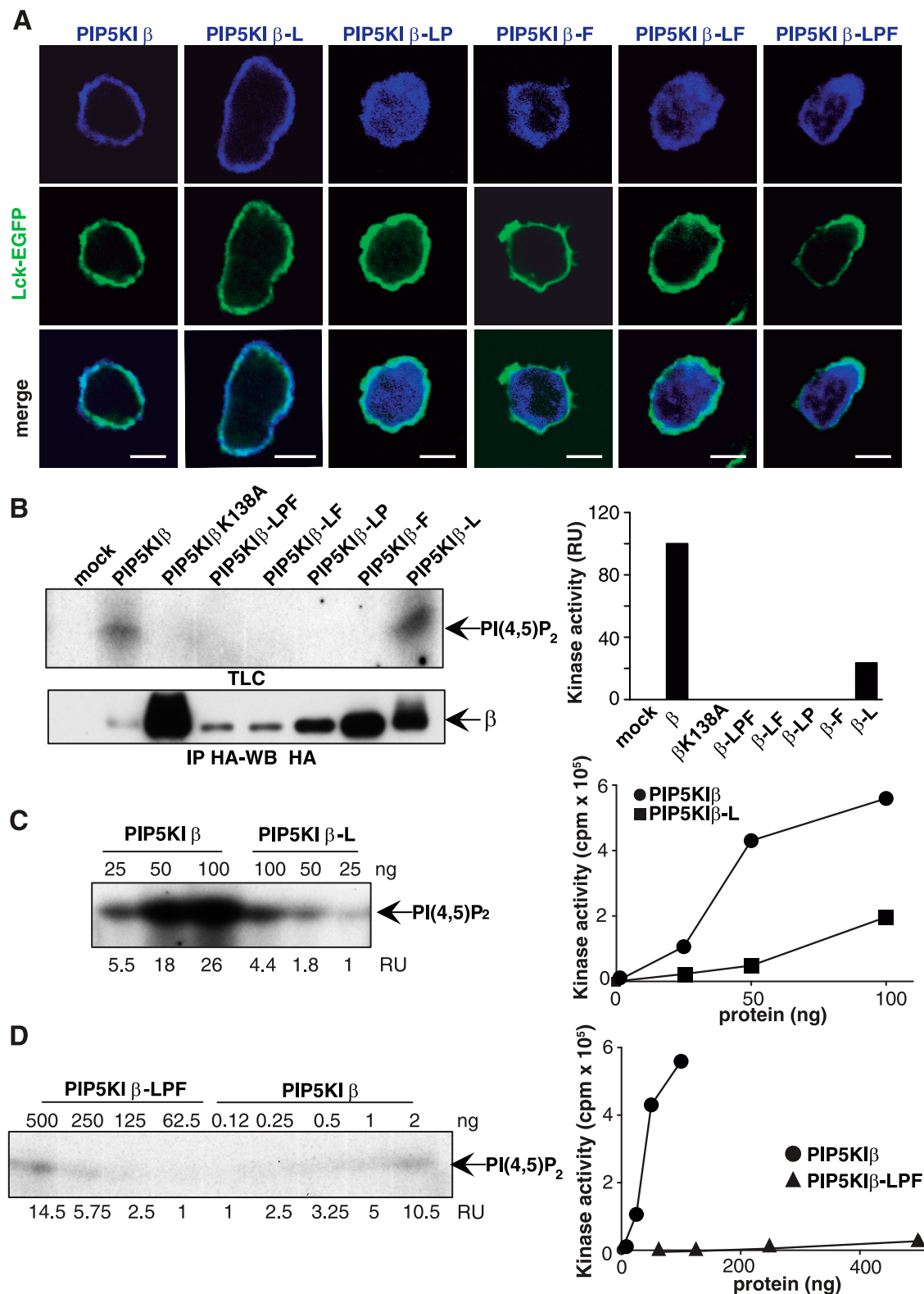
We used immunofluorescence to study the subcellular location of the PIP5K1 $\beta$  N-terminal mutants in dHL60 cells. Overexpressed HA-PIP5K1 $\beta$  and -PIP5K1 $\beta$ -L (a mutant with an altered  $\alpha$ -helix) colocalized with plasma membrane surrogate marker Lck-EGFP (Fig. 7A), a chimera that bears the double palmitoylation signal of p56LCK fused to the N terminus of EGFP (31). The PIP5K1 $\beta$ -LP mutant, in which Tyr39 replacement by Pro predicts torsion in the  $\alpha$ -helix, was found mainly in cytosol. Alteration of the  $\beta$ -sheet alone (PIP5K1 $\beta$ -F mutant) or the combination of  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet mutations (PIP5K1 $\beta$ -LF and PIP5K1 $\beta$ -LPF) also caused kinase localization in cytosol (Fig. 7A). Results were similar when the mutants were expressed in HEK-293T cells (Supplemental Fig. S4A). The data suggest that mutations in the dimerization region determine the subcellular location of the kinase.

Because N-terminal mutations delocalized the kinase from the membrane, we analyzed whether these mutations altered kinase interaction with lipids. We used

surface pressure measurements in a Langmuir balance to compare the interaction of purified PIP5K1 $\beta$  and PIP5K1 $\beta$ -LPF with lipid monolayers. Analysis of the air-water interface effects showed that wild-type and mutant proteins were surface active, with  $\pi_s$  values of 17.25 and 18.01 mN/m for PIP5K1 $\beta$  and PIP5K1 $\beta$ -LPF, respectively; the saturation concentrations were 12.5 and 9 nM for PIP5K1 $\beta$  and PIP5K1 $\beta$ -LPF, respectively (Supplemental Fig. S4B). The lack of marked differences between the wild-type and mutant suggests that their surfactant properties are not affected. Interaction with lipids was assayed using monolayers composed of phosphatidylcholine (ePC), PI4P (the PIP5K1 $\beta$  substrate), and DOPA, an activator of the kinase. The 4 monolayers tested were ePC, ePC:PI4P (95:5), ePC:DOPA (95:5), and ePC:PI4P:DOPA (90:5:5); PIP5K1 $\beta$  and PIP5K1 $\beta$ -LPF proteins were injected into the aqueous subphase at 19.11 and 15.94 nM, respectively. Measurement of lateral pressure change showed that both proteins inserted equally in all monolayers, with critical  $\pi_s$  values of  $\sim 26$  mN/m (Supplemental Fig. S4C), indicating comparable tensioactive properties. The LPF mutation thus does not appear to affect the intrinsic ability of the protein to interact with lipid monolayers or, probably, with low-curvature membranes (41).

#### Dimerization controls PIP5K1 $\beta$ kinase activity

To determine whether mutation of the dimerization motif affects enzyme activity, lipid kinase activity was measured in immunoprecipitates from HEK-293T cells that overexpressed PIP5K1 $\beta$  or the PIP5K1 $\beta$ -L, PIP5K1 $\beta$ -F, PIP5K1 $\beta$ -LP, PIP5K1 $\beta$ -LF, or PIP5K1 $\beta$ -LPF mutants. PI(4,5)P<sub>2</sub> was



(continued on next page)

generated by wild-type and PIP5KI $\beta$ -L proteins, but not by the other mutants (Fig. 7B). Lack of PI(4,5)P<sub>2</sub> production in immunoprecipitates of the kinase-dead PIP5KI $\beta$ <sup>K138A</sup> indicated kinase assay specificity. To further study the influence of the dimerization motif on PIP5KI $\beta$  enzyme activity, we performed titration assays using purified PIP5KI $\beta$ , PIP5KI $\beta$ -L, and PIP5KI $\beta$ -LPF enzymes. PIP5KI $\beta$ -L showed a 5-fold reduction in PI(4,5)P<sub>2</sub> generation compared to the wild-type kinase (Fig. 7C); PIP5KI $\beta$ -LPF showed only residual activity, ~2 orders of magnitude lower than the wild-type enzyme (Fig. 7D). These data thus show a correlation between alterations in the dimerization motif and in lipid kinase activity.

To rule out possible interference of endogenous PIP5KI $\beta$  in the kinase assays, we generated HEK-293T cell lines in which PIP5KI $\beta$  expression was knocked down using the CRISPR/Cas9 system. Of the 3 gRNAs used to target the N-terminal region of the gene (Supplemental Fig. S4D), 2 rendered clones with indel or frameshift mutations (Supplemental Fig. S4E); lack of endogenous PIP5KI $\beta$  in these clones was validated by Western blot (Supplemental Fig. S4F). We used these knockout cell lines to analyze the lipid kinase activity of the overexpressed HA-tagged mPIP5KI $\beta$ , mPIP5KI $\beta$ -L, and mPIP5KI $\beta$ -LPF; mouse PIP5KI $\beta$  was resistant to nuclease cleavage, as predicted with the CRISPR design tool. Measurement of lipid kinase activity in anti-HA immunoprecipitates from these cells (Supplemental Fig. S4G) again showed residual kinase activity for PIP5KI $\beta$ -LPF, and a clear reduction in PIP5KI $\beta$ -L activity compared to that of the wild-type enzyme (Supplemental Fig. S4H). These results indicate that the reduced kinase activity in the dimerization mutants is not affected by expression of endogenous PIP5KI $\beta$ .

## DISCUSSION

Based on homology-structural models using PIP5KII structure as a template, PIP5KI was suggested to form dimers (30). Here, we demonstrate that PIP5KI $\beta$  and PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub> readily form homo- and heterodimers *in vitro* and in live cells; this property might be extendable to PIP5KI $\alpha$  because our proteomic data suggest PIP5KI $\beta$ / $\alpha$  heterodimerization. Dimerization is intrinsic to enzyme structure and is not affected by the actin cytoskeleton. Modification of N-terminal residues involved in PIP5KI $\beta$  dimerization caused enzyme delocalization and loss of enzymatic activity. These mutants retained association to lipid monolayers and binding to C-terminal partners, indicating that the effects are not a result of protein misfolding. The data thus identify phosphatidylinositol phosphate kinase dimerization as a general strategy to regulate localization and activation in this lipid kinase family.

Structural modeling of PIP5KI based on PIP4KII crystallographic data suggested that PIP5KI dimerization is

necessary to create the contact surface needed to stabilize interaction with the inner face of the lipid bilayer (23, 30). Our results support this idea because the series of PIP5KI $\beta$  N-terminal mutants with impaired dimerization are mainly cytosolic proteins; dimerization appears to be necessary for stable interaction with the membrane. PIP5KI targeting to plasma membranes appears to be determined by co-operation of electrostatic interactions between anionic protein residues and cationic membrane lipids, and/or interaction with other membrane proteins (42). PIP5KI $\alpha$  localization at the plasma membrane during phagosome formation is regulated mainly by electrostatic interactions (30). Ras homolog gene family (Rho), member A (RhoA), Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac) (11), ADP-ribosylation factor 6 (43), and clathrin adaptor 2 proteins (44–46) regulate membrane association of several PIP5KI isoforms. Selective PIP5KI recruitment and activation are influenced by isoform-specific proteins such as EBP50 for PIP5KI $\beta$  (16), talin and exo70 for PIP5KI $\gamma$ <sub>i2</sub> (15, 40, 47), and Ajuba and BTK for PIP5KI $\alpha$  (48, 49). The observation that although they bind EBP50, most N-terminal mutants are cytosolic suggests that at least for PIP5KI $\beta$ , dimerization is crucial for plasma membrane localization.

We cannot rule out regulation of dimerization by binding partners, and it will be of interest to study whether proteins that bind the PIP5KI $\beta$  N terminus affect dimerization. For example, PIP5KI $\beta$  location to the plasma membrane depends on its interaction with Rac GTPase because the PIP5KI $\beta$ -E61L mutant shows reduced affinity for Rac and localizes in cytosol (50). The cytosolic PIP5KI $\beta$ -LPF mutant did not relocalize to the membrane when we overexpressed Rac in dHL60 cells (data not shown), indicating that PIP5KI $\beta$  localization is not controlled mainly by Rac in our system.

Here, we identify a structural element that determines PIP5KI interaction with the plasma membrane. This domain, located at the N terminus, is shared by all 3 PIP5KI isoforms and increases the list of shared PIP5KI domains involved in plasma membrane localization. The activation loop domain allows PI4P recognition and links substrate specificity and subcellular localization at the inner face of the plasma membrane (51, 52); in the kinase domain, its deletion or charge-reversal mutation of dibasic residues results in PIP5KI mislocalization (53).

PIP5KI activity and actin cytoskeleton dynamics are closely linked (54). PI(4,5)P<sub>2</sub> interacts with and regulates the activity of many actin-binding proteins and key regulators of the actin cytoskeleton, such as the Rho family of small GTPases, which reciprocally regulate PIP5KI isoenzymes (11). Our results indicate that actin reorganization is not necessary for PIP5KI plasma membrane localization or dimerization, and suggest that PIP5KI dimers are not the result of protein aggregation due to cytoskeleton rearrangement. The data

densitometry values (RU) are shown. Kinase activity (in cpm) is plotted as a function of protein amount [PIP5KI $\beta$  (●) and PIP5KI $\beta$ -L (■)] and shows a linear dose response. D) PIP5KI $\beta$ -LPF is catalytically inactive. PIP5KI $\beta$  (●) and PIP5KI $\beta$ -LPF (▲)-purified protein kinase activity was measured as in (B). TLC image with densitometry values (RU) and kinase activity graph (cpm) are shown. In all cases, one representative experiment is shown ( $n \geq 3$ ).

indicate that dimerization is an intrinsic PIP5KI property regulated by structural determinants. Our work also shows that PIP5KI $\beta$  or PIP5KI $\gamma_{i2}$  dimerization is unaffected by binding of EBP50 or talin, the respective binding partners of the PIP5KI $\beta$  and PIP5KI $\gamma_{i2}$  C termini. Changes in protein folding due to interaction with distant partners do not affect FRET values for dimerization, which supports the relevance of the dimerization domain as a driver for PIP5KI complex formation.

Several reports show that PIP5KI phosphorylation determines net charge, which might regulate its membrane localization and activity. Oxidative stress increases Y105 phosphorylation on PIP5KI $\beta$ , to induce membrane delocalization and reduce PIP5KI $\beta$  activity (55). PIP5KI $\beta$  phosphorylation at Ser413 (56) or Ser214 (57) leads to a reduction in lipid kinase activity. Our data show that PIP5KI $\beta$  mutations that affect  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet structures in the PIP5KI $\beta$  N-terminal region inhibit dimer formation and greatly reduce kinase activity; these findings indicate dimerization as a regulatory factor that could control PIP5KI $\beta$  catalytic activity. All our PIP5KI $\beta$  mutations involved a tyrosine residue at position 39. The Tyr39 mutation does not appear to affect net protein charge in this domain because we did not detect Tyr39 phosphorylation by liquid chromatography-mass spectrometry analysis in unstimulated or CXCL12-stimulated PIP5KI $\beta$ -expressing HEK-293 cells (data not shown). It is thus possible that electrostatic interactions are not a major force in PIP5KI $\beta$  dimer formation.

With the exception of the PIP5KI $\beta$ -L mutant, which had a mild phenotype, mutations that altered the  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet structures led to cytosolic delocalization, suggesting a pivotal role for this region in PIP5KI $\beta$  membrane localization. The PIP5KI $\beta$ -LPF mutant (in which both  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet were altered) showed  $\pi_s$  values similar to those of the wild-type kinase during its interaction with lipid monolayers, suggesting that interaction with lipids is independent of the dimerization motif. PIP5KI $\beta$  interaction with lipid monolayers also was independent of the substrate (PI4P) and of phosphatidic acid (PA), a classic PIP5KI activator, and no synergistic binding effect was observed after PI4P and PA addition. These results contrast with the PI4P and PA dependence and synergistic binding of PIP5KI $\alpha$  (30, 58) or PIP5KI $\gamma$  (59) to lipid-coated beads or liposomes. We propose that, in monolayers, PIP5KI $\beta$  adopts a flat dipole conformation in which the negative face interacts with positively charged phosphatidylcholine. Electrostatic interactions across the protein would stabilize the structure sufficiently that anionic lipid addition does not alter the spatial disposition of PIP5KI $\beta$  or change the surfactant properties; the dimerization motif is thus not needed for protein-lipid interaction. In cells, PIP5KI $\beta$  interaction with the lipid bilayer requires dimerization, probably to increase the contact area and to provide structural stability.

Dimerization-induced conformational changes might also affect catalytic activity. Residues important for catalysis (D350, D266, and K138) are located far from the dimerization interface, making it very unlikely that mutations that jeopardize the dimerization region would directly affect kinase activity. As Rao *et al.* (23) propose, whereas the monomer is nearly globular, the

dimer is an elongated disk; this conformational transition might lead to the reordering of disordered regions, which thereby acquire the correct structural conformation to enable catalytic activity. Disruption of the dimerization interface would impede transition to the elongated disk shape and thus impair catalytic activity. Confirmation of this hypothesis nonetheless requires the crystal structure of each isoform.

We showed that PIP5KI $\beta$  and PIP5KI $\gamma_{i2}$  are present as dimers and heterodimers at the surface of living cells. Our data suggest that interference with PIPKI dimerization has substantial effects on enzyme localization and activity, and provide a conceptual framework for the design of allosteric inhibitors to these enzymes. Heterodimerization could constitute an additional regulatory level in the crosstalk between PIP5KI isoforms, which might be central for local and temporal regulation of PI(4,5)P<sub>2</sub> synthesis during complex cell processes. **[F]**

The authors thank S. de Lucas for the generous gift of the plasmid and advice on tandem affinity purification, members of the Centro Nacional de Biotecnología Proteomics Facility (Madrid, Spain; ProteoRed Network member) for mass spectrometry analyses, and C. Mark for editorial assistance. J.C.d.K. is a Ph.D. fellow of the La Caixa Foundation International Fellowship Programme. This work was supported in part by the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2011-24453) and the Comunidad de Madrid (IMMUNOTHER-CAN; S2010/BMD-2326). The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Matthews, J., and Sunde, M. (2012) Dimers, oligomers, everywhere. In *Protein Dimerization and Oligomerization in Biology*, Vol. 747 (Matthews, J., ed.), pp. 1–18, Springer, New York
2. Shi, Z., Resing, K. A., and Ahn, N. G. (2006) Networks for the allosteric control of protein kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 686–692
3. Rajakulendran, T., Sahmi, M., Lefrançois, M., Sicheri, F., and Therrien, M. (2009) A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature* **461**, 542–545
4. Chung, I., Akita, R., Vandlen, R., Toomre, D., Schlessinger, J., and Mellman, I. (2010) Spatial control of EGF receptor activation by reversible dimerization on living cells. *Nature* **464**, 783–787
5. Muñoz, L. M., Holgado, B. L., Martínez-A, C., Rodríguez-Frade, J. M., and Mellado, M. (2012) Chemokine receptor oligomerization: a further step toward chemokine function. *Immunol. Lett.* **145**, 23–29
6. Zhang, L., Mao, Y. S., Janmey, P. A., and Yin, H. L. (2012) Phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate and the actin cytoskeleton. *Subcell. Biochem.* **59**, 177–215
7. McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A., and Murray, D. (2002) PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 151–175
8. Heck, J. N., Mellman, D. L., Ling, K., Sun, Y., Wagoner, M. P., Schill, N. J., and Anderson, R. A. (2007) A conspicuous connection: structure defines function for the phosphatidylinositol-phosphate kinase family. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42**, 15–39
9. Loijens, J. C., Boronenkov, I. V., Parker, G. J., and Anderson, R. A. (1996) The phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase family. *Adv. Enzyme Regul.* **36**, 115–140
10. Rameh, L. E., Tolia, K. F., Duckworth, B. C., and Cantley, L. C. (1997) A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **390**, 192–196
11. van den Bout, I., and Divecha, N. (2009) PIP5K-driven PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> synthesis: regulation and cellular functions. *J. Cell Sci.* **122**, 3837–3850



12. Xia, Y., Irvine, R. F., and Giudici, M. L. (2011) Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase I $\gamma$ v6, a new splice variant found in rodents and humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **411**, 416–420
13. Clarke, J. H., Wang, M., and Irvine, R. F. (2010) Localization, regulation and function of type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinases. *Adv. Enzyme Regul.* **50**, 12–18
14. Sun, Y., Thapa, N., Hedman, A. C., and Anderson, R. A. (2013) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: targeted production and signaling. *BioEssays* **35**, 513–522
15. Di Paolo, G., Pellegrini, L., Letinic, K., Cestra, G., Zoncu, R., Voronov, S., Chang, S., Guo, J., Wenk, M. R., and De Camilli, P. (2002) Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type I gamma by the FERM domain of talin. *Nature* **420**, 85–89
16. Lacalle, R. A., Peregil, R. M., Albar, J. P., Merino, E., Martínez-A, C., Mérida, I., and Mañes, S. (2007) Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase controls neutrophil polarity and directional movement. *J. Cell Biol.* **179**, 1539–1553
17. Ling, K., Bairstow, S. F., Carbonara, C., Turbin, D. A., Huntsman, D. G., and Anderson, R. A. (2007) Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase modulates adherens junction and E-cadherin trafficking via a direct interaction with mu 1B adaptin. *J. Cell Biol.* **176**, 343–353
18. Sun, Y., Hedman, A. C., Tan, X., Schill, N. J., and Anderson, R. A. (2013) Endosomal type I $\gamma$  PIP 5-kinase controls EGF receptor lysosomal sorting. *Dev. Cell* **25**, 144–155
19. Thapa, N., Sun, Y., Schram, M., Choi, S., Ling, K., and Anderson, R. A. (2012) Phosphoinositide signaling regulates the exocyst complex and polarized integrin trafficking in directionally migrating cells. *Dev. Cell* **22**, 116–130
20. de Pereda, J. M., Wegener, K. L., Santelli, E., Bate, N., Ginsberg, M. H., Critchley, D. R., Campbell, I. D., and Liddington, R. C. (2005) Structural basis for phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma binding to talin at focal adhesions. *J. Biol. Chem.* **280**, 8381–8386
21. Mañes, S., Fuentes, G., Peregil, R. M., Rojas, A. M., and Lacalle, R. A. (2010) An isoform-specific PDZ-binding motif targets type I PIP5 kinase beta to the uropod and controls polarization of neutrophil-like HL60 cells. *FASEB J.* **24**, 3381–3392
22. Burden, L. M., Rao, V. D., Murray, D., Ghirlando, R., Doughman, S. D., Anderson, R. A., and Hurley, J. H. (1999) The flattened face of type II beta phosphatidylinositol phosphate kinase binds acidic phospholipid membranes. *Biochemistry* **38**, 15141–15149
23. Rao, V. D., Misra, S., Boronenkov, I. V., Anderson, R. A., and Hurley, J. H. (1998) Structure of type IIbeta phosphatidylinositol phosphate kinase: a protein kinase fold flattened for interfacial phosphorylation. *Cell* **94**, 829–839
24. Clarke, J. H., and Irvine, R. F. (2013) Evolutionarily conserved structural changes in phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase (PI5P4K) isoforms are responsible for differences in enzyme activity and localization. *Biochem. J.* **454**, 49–57
25. Hinchliffe, K. A., Giudici, M. L., Letcher, A. J., and Irvine, R. F. (2002) Type IIalpha phosphatidylinositol phosphate kinase associates with the plasma membrane via interaction with type I isoforms. *Biochem. J.* **363**, 563–570
26. Wang, M., Bond, N. J., Letcher, A. J., Richardson, J. P., Lilley, K. S., Irvine, R. F., and Clarke, J. H. (2010) Genomic tagging reveals a random association of endogenous PtdIns5P 4-kinases IIalpha and IIbeta and a partial nuclear localization of the IIalpha isoform. *Biochem. J.* **430**, 215–221
27. Bultsma, Y., Keune, W. J., and Divecha, N. (2010) PIP4Kbeta interacts with and modulates nuclear localization of the high-activity PtdIns5P-4-kinase isoform PIP4Kalpha. *Biochem. J.* **430**, 223–235
28. Shulga, Y. V., Anderson, R. A., Topham, M. K., and Epand, R. M. (2012) Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase isoforms exhibit acyl chain selectivity for both substrate and lipid activator. *J. Biol. Chem.* **287**, 35953–35963
29. Galiano, F. J., Ulug, E. T., and Davis, J. N. (2002) Overexpression of murine phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type Ibeta disrupts a phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate regulated endosomal pathway. *J. Cell. Biochem.* **85**, 131–145
30. Fairn, G. D., Ogata, K., Botelho, R. J., Stahl, P. D., Anderson, R. A., De Camilli, P., Meyer, T., Wodak, S., and Grinstein, S. (2009) An electrostatic switch displaces phosphatidylinositol phosphate kinases from the membrane during phagocytosis. *J. Cell Biol.* **187**, 701–714
31. Lacalle, R. A., Mira, E., Gómez-Mouton, C., Jiménez-Baranda, S., Martínez-A, C., and Mañes, S. (2002) Specific SHP-2 partitioning in raft domains triggers integrin-mediated signaling via Rho activation. *J. Cell Biol.* **157**, 277–289
32. de Lucas, S., Peredo, J., Marión, R. M., Sánchez, C., and Ortín, J. (2010) Human Staufin1 protein interacts with influenza virus ribonucleoproteins and is required for efficient virus multiplication. *J. Virol.* **84**, 7603–7612
33. Martínez-Muñoz, L., Barroso, R., Dyrhaug, S. Y., Navarro, G., Lucas, P., Soriano, S. F., Vega, B., Costas, C., Muñoz-Fernández, M. A., Santiago, C., Rodríguez Frade, J. M., Franco, R., and Mellado, M. (2014) CCR5/CD4/CXCR4 oligomerization prevents HIV-1 gp120IIIB binding to the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, E1960–E1969
34. Martínez Muñoz, L., Lucas, P., Navarro, G., Checa, A. I., Franco, R., Martínez-A, C., Rodríguez-Frade, J. M., and Mellado, M. (2009) Dynamic regulation of CXCR1 and CXCR2 homo- and heterodimers. *J. Immunol.* **183**, 7337–7346
35. Motulsky, H., and Christopoulos, A. (2004) *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression. A Practical Guide to Curve Fitting*, Oxford University Press, New York
36. Katoh, K., and Standley, D. M. (2014) MAFFT: iterative refinement and additional methods. *Methods Mol. Biol.* **1079**, 131–146
37. Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G., and Zhang, F. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* **31**, 827–832
38. Sanjana, N. E., Shalem, O., and Zhang, F. (2014) Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* **11**, 783–784
39. Audet, N., Galés, C., Archer-Lahlou, E., Vallières, M., Schiller, P. W., Bouvier, M., and Pineyro, G. (2008) Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signaling complexes containing delta-opioid receptors and heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* **283**, 15078–15088
40. Ling, K., Doughman, R. L., Firestone, A. J., Bunce, M. W., and Anderson, R. A. (2002) Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature* **420**, 89–93
41. Brezesinski, G., and Möhwald, H. (2003) Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **100-102**, 563–584
42. Kwiatkowska, K. (2010) One lipid, multiple functions: how various pools of PI(4,5)P(2) are created in the plasma membrane. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 3927–3946
43. Funakoshi, Y., Hasegawa, H., and Kanaho, Y. (2011) Regulation of PIP5K activity by Arf6 and its physiological significance. *J. Cell. Physiol.* **226**, 888–895
44. Krauss, M., Kukhtina, V., Pechstein, A., and Haucke, V. (2006) Stimulation of phosphatidylinositol kinase type I-mediated phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate synthesis by AP-2mu-cargo complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11934–11939
45. Bairstow, S. F., Ling, K., Su, X., Firestone, A. J., Carbonara, C., and Anderson, R. A. (2006) Type Igamma661 phosphatidylinositol phosphate kinase directly interacts with AP2 and regulates endocytosis. *J. Biol. Chem.* **281**, 20632–20642
46. Kahlfeldt, N., Vahedi-Faridi, A., Koo, S. J., Schäfer, J. G., Krainer, G., Keller, S., Saenger, W., Krauss, M., and Haucke, V. (2010) Molecular basis for association of PIPKI gamma-p90 with clathrin adaptor AP-2. *J. Biol. Chem.* **285**, 2734–2749
47. He, B., Xi, F., Zhang, X., Zhang, J., and Guo, W. (2007) Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane. *EMBO J.* **26**, 4053–4065

48. Kisseleva, M., Feng, Y., Ward, M., Song, C., Anderson, R. A., and Longmore, G. D. (2005) The LIM protein Ajuba regulates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels in migrating cells through an interaction with and activation of PIPKI alpha. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 3956–3966
49. Saito, K., Tolias, K. F., Saci, A., Koon, H. B., Humphries, L. A., Scharenberg, A., Rawlings, D. J., Kinet, J. P., and Carpenter, C. L. (2003) BTK regulates PtdIns-4,5-P<sub>2</sub> synthesis: importance for calcium signaling and PI3K activity. *Immunity* **19**, 669–678
50. Halstead, J. R., Savaskan, N. E., van den Bout, I., Van Horck, F., Hajdo-Milasnovic, A., Snell, M., Keune, W. J., Ten Klooster, J. P., Hordijk, P. L., and Divecha, N. (2010) Rac controls PIP5K localisation and PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> synthesis, which modulates vinculin localisation and neurite dynamics. *J. Cell Sci.* **123**, 3535–3546
51. Kunz, J., Fuelling, A., Kolbe, L., and Anderson, R. A. (2002) Stereo-specific substrate recognition by phosphatidylinositol phosphate kinases is swapped by changing a single amino acid residue. *J. Biol. Chem.* **277**, 5611–5619
52. Kunz, J., Wilson, M. P., Kisseleva, M., Hurley, J. H., Majerus, P. W., and Anderson, R. A. (2000) The activation loop of phosphatidylinositol phosphate kinases determines signaling specificity. *Mol. Cell* **5**, 1–11
53. Arioka, M., Nakashima, S., Shibasaki, Y., and Kitamoto, K. (2004) Dibasic amino acid residues at the carboxy-terminal end of kinase homology domain participate in the plasma membrane localization and function of phosphatidylinositol 5-kinase gamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 456–463
54. Mao, Y. S., and Yin, H. L. (2007) Regulation of the actin cytoskeleton by phosphatidylinositol 4-phosphate 5 kinases. *Pflugers Arch.* **455**, 5–18
55. Chen, M. Z., Zhu, X., Sun, H. Q., Mao, Y. S., Wei, Y., Yamamoto, M., and Yin, H. L. (2009) Oxidative stress decreases phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels by deactivating phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase beta in a Syk-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **284**, 23743–23753
56. van den Bout, I., Jones, D. R., Shah, Z. H., Halstead, J. R., Keune, W. J., Mohammed, S., D'Santos, C. S., and Divecha, N. (2013) Collaboration of AMPK and PKC to induce phosphorylation of Ser413 on PIP5K1B resulting in decreased kinase activity and reduced PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> synthesis in response to oxidative stress and energy restriction. *Biochem. J.* **455**, 347–358
57. Park, S. J., Itoh, T., and Takenawa, T. (2001) Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type I is regulated through phosphorylation response by extracellular stimuli. *J. Biol. Chem.* **276**, 4781–4787
58. Szymańska, E., Sobota, A., Czuryło, E., and Kwiatkowska, K. (2008) Expression of PI(4,5)P<sub>2</sub>-binding proteins lowers the PI(4,5)P<sub>2</sub> level and inhibits FcγRIIA-mediated cell spreading and phagocytosis. *Eur. J. Immunol.* **38**, 260–272
59. Roach, A. N., Wang, Z., Wu, P., Zhang, F., Chan, R. B., Yonekubo, Y., Di Paolo, G., Gorge, A. A., and Du, G. (2012) Phosphatidic acid regulation of PIPKI is critical for actin cytoskeletal reorganization. *J. Lipid Res.* **53**, 2598–2609

Received for publication September 17, 2014.

Accepted for publication February 3, 2015.







